

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003458

International filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-057559  
Filing date: 02 March 2004 (02.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

11.3.2005

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 3月 2日  
Date of Application:

出願番号 特願2004-057559  
Application Number:

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

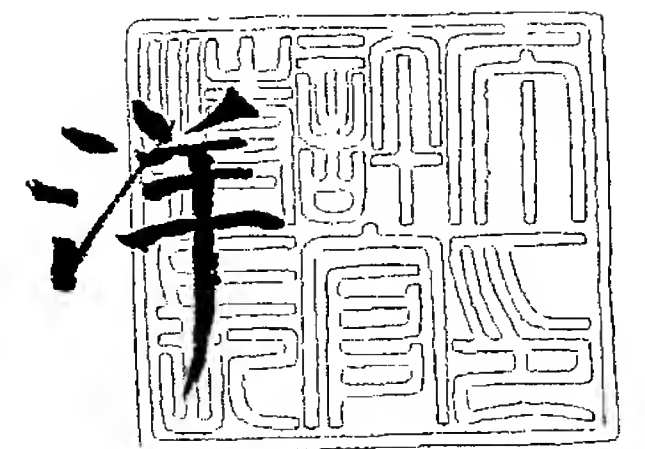
JP2004-057559

出願人 エーザイ株式会社  
Applicant(s):

2005年 4月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3035363

【書類名】 特許願  
【整理番号】 E1-A0208  
【提出日】 平成16年 3月 2日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市下京区中堂寺南町 1 0 7 上原マンション 4 0 5  
    【氏名】 松井 毅  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市下京区西七条赤社町 3 2 MONO. COMODO  
    御前 1 2 0 3 号  
    【氏名】 喜住 文枝  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市下京区西七条市部町 1 1 6 フォレスト七条 4 0 4  
    号  
    【氏名】 木下 曜子  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000000217  
    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100102978  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 清水 初志  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100108774  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 橋本 一憲  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 041092  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

下記 (a) ~ (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号: 2、4、6 または 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(b) 配列番号: 1、3、5 または 7 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

(c) 配列番号: 2、4、6 または 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号: 1、3、5 または 7 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

## 【請求項 2】

ケラチノサイトの分化または増殖に関与する遺伝子であって、分泌タンパク質をコードする請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

## 【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

## 【請求項 5】

請求項 1 もしくは 2 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 4 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、請求項 3 に記載のポリペプチドの製造方法。

## 【請求項 7】

共通の遺伝子発現調節下にあることを特徴とする遺伝子複合体であって、(1) Kdap 遺伝子、(2) dermokine- $\alpha$  遺伝子、(3) dermokine- $\beta$  遺伝子、および (4) suprabasin 遺伝子の各遺伝子から構成されるケラチノサイトの分化または増殖に関与する遺伝子複合体。

## 【請求項 8】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド。

## 【請求項 9】

請求項 1 もしくは 2 に記載のポリヌクレオチドまたはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド。

## 【請求項 10】

請求項 3 に記載のポリペプチドに結合する抗体。

## 【請求項 11】

dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくは dermokine- $\beta$  タンパク質を有効成分として含む、ケラチノサイト分化誘導剤。

## 【請求項 12】

以下の (a) ~ (d) からなる群より選択される化合物を含む、ケラチノサイト分化抑制剤。

(a) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくは dermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸

(b) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくは dermokine- $\beta$  遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリ



ボザイム活性を有する核酸

(c) dermokine- $\alpha$  遺伝子もしくはdermokine- $\beta$  遺伝子の発現を、RNAi 効果による阻害作用を有する核酸

(d) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質と結合する抗体

【請求項 13】

以下の工程 (a) ~ (c) を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を発現する細胞と、被検化合物を接触させる工程

(b) 該細胞におけるdermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記発現量または活性を上昇させる化合物を選択する工程

【請求項 14】

以下の工程 (a) ~ (c) を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を発現する細胞と、被検化合物を接触させる工程

(b) 該細胞におけるdermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記発現量または活性を低下させる化合物を選択する工程

【請求項 15】

以下の工程 (a) ~ (c) を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらが発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を上昇させる化合物を選択する工程

【請求項 16】

以下の工程 (a) ~ (c) を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらが発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を低下させる化合物を選択する工程

【請求項 17】

以下の工程 (a) および (b) を含む、被検細胞について、重層上皮から派生した癌細胞か否かを検査する方法。

(a) 被検細胞について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検細胞は重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定する工程

【請求項 18】

以下の工程 (a) および (b) を含む、被検者について、扁平上皮癌または基底細胞癌の診断方法。

(a) 被検者から調製された細胞試料について、請求項 17 に記載の方法により、重層上皮から派生した癌細胞か否かを判定する工程、

(b) 前記工程により、重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定された場合に、被検者は、扁平上皮癌または基底細胞癌に罹患しているものと判定する工程

【請求項 19】

以下の工程 (a) および (b) を含む、被検者について、皮膚疾患の診断方法。

(a) 被検者から調製された被検試料について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検者は皮膚疾患に罹患しているものと判定する工程

【請求項 2 0】

皮膚疾患が乾皮症、乾癬、または魚鱗癬である、請求項 1 9 に記載の診断方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】表皮分化に関与する新規遺伝子、およびその利用

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、重層上皮で発現する新規分泌タンパク質に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

表皮は高度に角化した典型的な重層扁平上皮であり、これは基底細胞層、有棘細胞層、顆粒細胞層および角化細胞層から構成される。表皮細胞（ケラチノサイト）は基底細胞層から角化細胞層へと上方に移動する。この移動は特徴的な形態変化と同時に、ケラチノサイトの特徴的な分化を伴う。分化の最終ステージでは、ケラチノサイトは細胞内オルガネラを失い、角化層を構成するために扁平形になる。そこで、ケラチノサイト分化の間の遺伝子発現への空間的および時間的な変化パターンが、皮膚病学者だけでなく、細胞生物学者においても興味をひいている（非特許文献 1～3）。例えば、基底膜におけるケラチノサイトは増殖性が高く、基底型のケラチン対（K5/K14）を発現する。ケラチノサイトは基底膜から離れると分化し、K5/K14から基底層上層型の対であるK1/K10までのケラチン発現における変化によって特徴付けられる（非特許文献 4～7）。さらに、その上部の有棘細胞および顆粒細胞層においても、ケラチノサイトは、角化膜（CE）および架橋結合酵素であるトランスグルタミナーゼ（TGase）1などの前駆タンパク質の合成を開始する。角化膜（CE）は角化層ではケラチノサイトのプラスマ膜の細胞質顆粒側で高度な不溶性構造を有し、TGase 1によって架橋結合される様々なタイプのタンパク質から成り立っている（非特許文献 8～11）。

【0 0 0 3】

表皮のバリアー機能の観点から、CEの構成要素はかなり同定されており、例えばシスタチン、デスモプラキン、エンボプラキン、エラフィン、フィラグリンおよびその他のケラチン類はもちろんのこと、インボルクリン、スモールプロリンリッチタンパク質ファミリーメンバー（SPRRP）およびロリクリンがある（非特許文献 11）。さらに、repetin、hornein、periphilinが推定CE前駆タンパク質として同定されている（非特許文献 12～14）。興味深いことに、これらのCE-関連タンパク質の多くは、ヒト染色体1q21（非特許文献 15～17）およびマウス3番染色体（非特許文献 18および19）上のいわゆる「Epidermal differentiation complex(EDC)」としてクラスター化した遺伝子によってコードされる。しかし、ペリプラキン、scellin、エンボプラキン、hornein およびperiphilinをコードしているいくつかのCEタンパク質遺伝子はEDCに位置していない（非特許文献 20～22、13、14参照）。EDCは、角化過程の原因となる少なくとも32種の遺伝子からなり、これらの遺伝子はその構造に基づいて3つのグループに分類される（非特許文献 23参照）。第1のグループであるインボルクリン、ロリクリンおよびSPRRPはそれぞれ中心領域に短い縦列反復配列を有する（非特許文献 24）。第2のグループであるプロフィラグリン、トリコヒアリンおよびrepetinは、融合遺伝子サブグループと呼ばれ、N末端領域にEFハンドドメインを有し、その後多数の縦列反復配列がある。第3のグループであるS 100ファミリーのメンバーは、EFハンドモチーフをもつ。

【0 0 0 4】

現在、マウスゲノムと同じくヒトにおける全ての遺伝子が同定され、今後はケラチノサイトの分化における遺伝子発現パターンの空間的および時間的な変化が、ゲノムワイドな方法でより計画的に分析されると考えられる。

最近の分子生物学的および生化学的技術の進歩により、in vivoおよびin vitroにおいて、ヒトケラチノサイト中の多数の遺伝子およびタンパク質の発現を研究することが可能になった。Celisらは、2次元ポリアクリルアミド電気泳動を用い、表皮および培養したケラチノサイト中の多数のタンパク質の発現を明らかにした（非特許文献 25）。Katzらは、ケラチノサイト培養液中の分泌タンパク質の部分的カタログを報告した（非特許文献 26）。無作為に配列決定したケラチノサイトcDNAライブラリー（非特許文献 27および28）。

8)、ディファレンシャルディスプレイPCR(非特許文献29~34)、cDNAマイクロアレイ(非特許文献35~37)、遺伝子発現の連続分析(非特許文献38および39)並びにシグナル配列トラップ(非特許文献40)は、ケラチノサイトの多くの遺伝子およびタンパク質の発現プロファイルを提供した。

#### 【0005】

しかし、皮膚全体をcDNAライブラリーまたは細胞溶解液の調製に使用する場合は、これは、ケラチノサイト、メラニン細胞、繊維芽細胞、皮脂性上皮細胞(sebocyte)、内皮細胞、神経細胞または筋細胞のような異種構造を含み、このことがケラチノサイトそれ自身の遺伝子発現プロファイルの分析を困難にしている。一部の報告において、研究者達は、初代培養したケラチノサイトを使用し、かつこれらを鑑別し、浮遊培養(raft culture)により重層上皮を形成し、ケラチノサイト自身の情報を得ている(非特許文献41~45)。しかし、この系においても表皮の個別の層における遺伝子発現情報を得るのは困難である。

#### 【0006】

【非特許文献1】Watt FM著、「Terminal differentiation of epidermal keratinocytes.」、Curr. Opin. Cell Biol.、1989年、Vol.1、p.1107-1115

【非特許文献2】Eckert RL著、「Structure, function and differentiation of the keratinocyte.」、Physiol. Rev.、1989年、Vol.69、p.1316-1346

【非特許文献3】Eckert RL, Crish JF, Robinson NA著、「The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation.」、Physiol. Rev.、1997年、Vol.77、p.397-424

【非特許文献4】Fuchs E, Green H著、「Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte.」、Cell、1980年、Vol.19、p.1033-1042

【非特許文献5】Moll R, Franke WW, Volc-Platzter B, Krepler R著、「Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas.」、J Cell Biol、1982年、Vol.95、p.285-295

【非特許文献6】Fuchs E and Byrne C著、「The epidermis rising to the surface.」、Curr. Opin. Genetics Dev.、1994年、Vol.4、p.725-736

【非特許文献7】Fuchs E著、「Keratins and the skin.」、Annu. Rev. Cell Dev. Biol.、1995年、Vol.11、p.123-153

【非特許文献8】Roop, D.著、「Defects in the barrier.」、Science、1995年、Vol.267、p.474-475

【非特許文献9】Ishida-Yamamoto A, Iizuka H著、「Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders.」、Exp. Dermatol.、1998年、Vol.7、p.1-10

【非特許文献10】Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM著、「Assembly of epidermal cornified cell envelope.」、J. Cell Sci.、2001年、Vol.114、p.3069-3070

【非特許文献11】Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM著、「Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope.」、BioEssays、2002年、Vol.24、p.789-800

【非特許文献12】Krieg P, Schuppler M, Koesters R, Mincheva A, Lichter P, and Marks F著、「Repetin (Rptn), a new member of the "fused gene" subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein.」、Genomics、1997年、Vol.43、p.339-348

【非特許文献13】Makino T, Takaishi M, Morohashi M, Huh N著、「Hornein, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin.」、J Biol. Chem.、2001年、Vol.276、p.47445-47452



【非特許文献 1 4】Kazerounian S, Aho S 著、「Characterization of periphilin, a widespread, highly insoluble nuclear protein and potential constituent of the keratinocyte cornified envelope.」、J. Biol. Chem.、2003年、Vol.278、p.36707-36717

【非特許文献 1 5】Volz A, Korge BP, Compton JG, Ziegler A, Steinert PM, Mischke D 著、「Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21.」、Genomics、1993年、Vol.18、p.92-99

【非特許文献 1 6】Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A 著、「Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21.」、J. Invest. Dermatol.、1996年、Vol.106、p.989-992

【非特許文献 1 7】Marenholz I, Volz A, Ziegler A, Davies A, Ragoussis I, Korge BP, Mischke D 著、「Genetic analysis of the epidermal differentiation complex (EDC) on human chromosome 1q21: chromosomal orientation, new markers, and a 6-Mb YAC contig.」、Genomics、1996年、Vol.37、p.295-302

【非特許文献 1 8】Rothnagel JA, Longley MA, Bundman DS, Naylor SL, Lalley PA, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Roop DR 著、「Characterization of the mouse loricrin gene: linkage with profilin and the flaky tail and soft coat mutant loci on chromosome 3.」、Genomics、1994年、Vol.23、p.450-456

【非特許文献 1 9】Song HJ, Poy G, Darwiche N, Lichti U, Kuroki T, Steinert P M, Kartasova T 著、「Mouse Sprr2 genes: a clustered family of genes showing differential expression in epithelial tissues.」、Genomics、1999年、Vol.55、p.28-42

【非特許文献 2 0】Aho S, McLean WHI, Li K, Uitto J 著、「cDNA cloning, mRNA expression, and chromosomal mapping of human and mouse periplakin genes.」、Genomics、1998年、Vol.48、p.242-247

【非特許文献 2 1】Champlaud M, Burgeson RE, Jin W, Baden HP, Olson PF 著、「cDNA cloning and characterization of sciellin, a LIM domain protein of the keratinocyte cornified envelope.」、J. Biol. Chem.、1998年、Vol.273、p.31547-31554

【非特許文献 2 2】Maata A, Ruhrberg C, Watt F 著、「Structure and regulation of the envoplakin gene.」、J. Biol. Chem.、2000年、Vol.275、p.19857-19865 (左記「Maata」の「a」は、「a」にウムラウトである。)

【非特許文献 2 3】Marenholtz I, Zirra M, Fischer DF, Backendorf C, Ziegler A, Mischke D 著、「Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library.」、Genome Research、2001年、Vol.11、p.341-355

【非特許文献 2 4】Backendorf C and Hohl D 著、「A common origin for cornified envelope proteins?」、Nat. Genet.、1992年、Vol.2、p.91

【非特許文献 2 5】Celis JE, Rasmussen HH, Gromov P 著、「The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995). mapping components of signal transduction pathways.」、Electrophoresis、1995年、Vol.16、p.2177-2240

【非特許文献 2 6】Katz AB, and Taichman LB 著、「A partial catalogue of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture.」、J. Invest. Dermatol.、1999年、Vol.112、p.818-821

【非特許文献 2 7】Konishi K, Morishima Y, Ueda E, Kibe Y, Nonomura K, Yamani shi K, Yasuno H 著、「Cataloging of the genes expressed in human keratinocytes: analysis of 607 randomly isolated cDNA sequences.」、Biochem. Biophys. R

es. Commun.、1994年、Vol.202、p.976-983

【非特許文献 2 8】Kita H, Okubo K, Matsubara K 著、「[an expression profile of active genes in cultured human keratinocytes.]」、DNA Res.、1996年、Vol.3、p.1-7

【非特許文献 2 9】Frank S, Werner S 著、「[The human homologue of the yeast CHL1 gene is a novel keratinocyte growth factor-regulated gene.]」、J. Biol. Chem.、1996年、Vol.271、p.24337-24340

【非特許文献 3 0】Frank S, Munz B, Werner S 著、「[The human homologue of a bovine nonselenium glutathione peroxidase is a novel keratinocyte growth factor-regulated gene.]」、Oncogene、1997年、Vol.14、p.915-921

【非特許文献 3 1】Munz B, Gerke V, Gillitzer R, Werner S 著、「[Differential expression of the calpain I subunits annexin II and p11 in cultured keratinocytes and during wound repair.]」、J. Invest. Dermatol.、1997年、Vol.108、p.307-312

【非特許文献 3 2】Rivas MV, Jarvis ED, Morisaki S, Carbonaro H, Gottlieb AB, Krueger JG 著、「[Identification of aberrantly regulated genes in diseased skin using the cDNA differential display technique]」、J. Invest. Dermatol.、1997年、Vol.108、p.188-194

【非特許文献 3 3】Rutberg SE, Lee EJ, Hansen LH, Glick AB, Yuspa SH 著、「[Identification of differentially expressed genes in chemically induced skin tumors.]」、Mol. Carcinogen.、1997年、Vol.20、p.80-98

【非特許文献 3 4】DiSepio D, Ghosn C, Eckert RL, Deucher A, Robinson N, Duval M, Chandraratna RAS, Nagpal S 著、「[Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene.]」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、1998年、Vol.95、p.14811-14815

【非特許文献 3 5】Trenkle T, Welsh J, Jung B, Mathieu-Daude F, McClelland M 著、「[Nonstoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays.]」、Nucleic Acids Res.、1998年、Vol.26、p.3883-3891

【非特許文献 3 6】Cole J, Tsou R, Wallance K, Gibran N, Isik F 著、「[Early gene expression profile of human skin to injury using high-density cDNA microarrays.]」、Wound Repair and Degeneration、2001年、Vol.9、p.360-370

【非特許文献 3 7】Bernard FX, Pedretti N, Rosdy M, Deguercey A 著、「[Comparison of gene expression profiles in human keratinocyte mono-layer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis.]」、Exp. Dermatol.、2002年、Vol.11、p.59-74

【非特許文献 3 8】Jansen BJH, Van Ruissen F, De Jongh G, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J 著、「[Serial analysis of gene expression in differentiated cultures of human epidermal keratinocytes.]」、J. Invest. Dermatol.、2001年、Vol.116、p.12-22

【非特許文献 3 9】Ruissen FV, Jansen BJH, deJongh GJ, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J 著、「[A partial transcriptome of human epidermis]」、Genomics、2002年、Vol.79、p.671-678

【非特許文献 4 0】Bonkobara M, Das A, Takao J, Cruzjr PD, Ariizumi K 著、「[Identification of novel genes for secreted and membrane-anchored proteins in human keratinocytes.]」、Brit. J. Dermatology、2003年、Vol.148、p.654-664

【非特許文献 4 1】Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T 著、「[Living tissue formed in vivo and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness.]」、Science、1981年、Vol.211、p.1052-1054

【非特許文献 4 2】Mackenzie IC, Fusenig NE 著、「[Regeneration of organized ep

ithelial structure.」、J. Invest. Dermatol.、1983年、Vol.81、p.189s-194s

【非特許文献 4 3】 Asselineau D, Prunieras M 著、「Reconstruction of simplified skin: control of fabrication.」、Br.J. Dermatol.、1984年、Vol.111、p.219-222

【非特許文献 4 4】 Parenteau NL, Nolte CM, Bilbo P, Rosenberg M, Wilkins LM, Johnson EW, Watson S, Mason VS, Bell E 著、「Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications.」、J Cell Biochem.、1991年、Vol.45、p.245-251

【非特許文献 4 5】 Stark HJ, Baur M, Breitzkreutz D, Mirancea M, Fusenig NE 著、「Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation.」、J. Invest. Dermatol.、1999年、Vol.112、p.681-691

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、表皮分化に関与する新規遺伝子の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。表皮分化にかかわる新規遺伝子を同定する目的で、本発明者らは「ハイスループット in situ ハイブリダイゼーションシステム (HT-ISH)」と呼ばれる最近確立された遺伝子スクリーニング方法 (Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S: Anal. Biochem. 254:23-30, 1997) をマウス足蹠表皮に対して用いた。この方法は、個々の細胞層を分離することなく、「無傷の」表皮におけるケラチノサイトの個別の層における遺伝子の発現パターンを分析することが可能である。この方法をマウス足底表皮切片に適用することにより、本発明者らは無傷の表皮において層特異的な発現を示す～100個の遺伝子の同定に成功した。その中から、本発明者らは、表皮の有棘層で特異的に発現する分泌ペプチドである 1 つの新規な遺伝子の 2 つのスプライシングバリエーションである dermokine- $\alpha$  および  $\beta$  を同定および特長付けした。ゲノムデータベースをこれらの配列に関して検索したところ、その遺伝子が 2 つの他のケラチノサイトタンパク質である、suprabasin (スプラバシン) (Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: J. Biol. Chem. 277:45195-45202, 2002) およびケラチノサイト分化関連タンパク質 (Kdap) (Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Gene. 256:19-27, 2000) をコードするゲノム遺伝子座に位置することが判明した。本発明者らは、suprabasin および Kdap も分泌ペプチドであること、および dermokine- $\alpha$  /  $\beta$ 、suprabasin および Kdap が重層上皮において主に発現されることを示した。これらの知見は、SSC (Stratified epithelium secreted peptides complex) と仮に命名された新規な重層上皮関連遺伝子クラスターの存在を明らかにした。

さらに本発明者らは、dermokine- $\alpha$  が、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有することを見出した。

以上の結果は、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$ 、Kdap および suprabasin という 4 種の分泌タンパク質が、SSC と命名した新規遺伝子複合体を形成し、重層化の開始時に発現され、ケラチノサイトの分化誘導に関与していることを示している。

GeneBank AY444557, AY444558 には、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の塩基配列と類似の配列が公開されているが、本明細書に記載の dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子と塩基配列が異なり、またその活性も明らかにされていない。

【0009】

本発明は、表皮分化に関与する新規遺伝子、および該遺伝子を含む遺伝子複合体に関し、より具体的には、

〔1〕 下記 (a) ～ (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチド、

(a) 配列番号: 2、4、6 または 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプ



チドをコードするポリヌクレオチド

(b) 配列番号: 1、3、5 または 7 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

(c) 配列番号: 2、4、6 または 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号: 1、3、5 または 7 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

[2] ケラチノサイトの分化または増殖に関与する遺伝子であって、分泌タンパク質をコードする [1] に記載のポリヌクレオチド、

[3] [1] または [2] に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド

[4] [1] または [2] に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター、

[5] [1] もしくは [2] に記載のポリヌクレオチド、または [4] に記載のベクターを保持する宿主細胞、

[6] [5] に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、[3] に記載のポリペプチドの製造方法、

[7] 共通の遺伝子発現調節下にあることを特徴とする遺伝子複合体であって、(1) Kdap 遺伝子、(2) *dermokine- $\alpha$*  遺伝子、(3) *dermokine- $\beta$*  遺伝子、および (4) *suprabasin* 遺伝子の各遺伝子から構成されるケラチノサイトの分化または増殖に関与する遺伝子複合体、

[8] [1] または [2] に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド、

[9] [1] もしくは [2] に記載のポリヌクレオチドまたはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド、

[10] [3] に記載のポリペプチドに結合する抗体、

[11] *dermokine- $\alpha$*  タンパク質もしくは *dermokine- $\beta$*  タンパク質を有効成分として含む、ケラチノサイト分化誘導剤、

[12] 以下の (a) ~ (d) からなる群より選択される化合物を含む、ケラチノサイト分化抑制、

(a) *dermokine- $\alpha$*  遺伝子もしくは *dermokine- $\beta$*  遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸

(b) *dermokine- $\alpha$*  遺伝子もしくは *dermokine- $\beta$*  遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸

(c) *dermokine- $\alpha$*  遺伝子もしくは *dermokine- $\beta$*  遺伝子の発現を、RNAi 効果による阻害作用を有する核酸

(d) *dermokine- $\alpha$*  タンパク質もしくは *dermokine- $\beta$*  タンパク質と結合する抗体

[13] 以下の工程 (a) ~ (c) を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法、

(a) *dermokine- $\alpha$*  タンパク質もしくは *dermokine- $\beta$*  タンパク質を発現する細胞と、被検化合物を接触させる工程

(b) 該細胞における *dermokine- $\alpha$*  タンパク質もしくは *dermokine- $\beta$*  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記発現量または活性を上昇させる化合物を選択する工程

[14] 以下の工程 (a) ~ (c) を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法、

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を発現する細胞と、被検化合物を接触させる工程

(b) 該細胞におけるdermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、前記発現量または活性を低下させる化合物を選択する工程

〔15〕 以下の工程 (a) ~ (c) を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法、

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらが発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を上昇させる化合物を選択する工程

〔16〕 以下の工程 (a) ~ (c) を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法、

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらが発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を低下させる化合物を選択する工程

〔17〕 以下の工程 (a) および (b) を含む、被検細胞について、重層上皮から派生した癌細胞か否かを検査する方法、

(a) 被検細胞について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検細胞は重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定する工程

〔18〕 以下の工程 (a) および (b) を含む、被検者について、扁平上皮癌または基底細胞癌の診断方法、

(a) 被検者から調製された細胞試料について、〔17〕に記載の方法により、重層上皮から派生した癌細胞か否かを判定する工程、

(b) 前記工程により、重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定された場合に、被検者は、扁平上皮癌または基底細胞癌に罹患しているものと判定する工程

〔19〕 以下の工程 (a) および (b) を含む、被検者について、皮膚疾患の診断方法

(a) 被検者から調製された被検試料について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検者は皮膚疾患に罹患しているものと判定する工程

〔20〕 皮膚疾患が乾皮症、乾癬、または魚鱗癬である、〔19〕に記載の診断方法、を提供するものである。

#### 【発明の効果】

##### 【0010】

本発明により、SSCが、多層化された上皮において発現され、かつ分化特異的様式で誘導されることが示された。したがって、SSCが上皮ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与することが考えられる。dermokineノックアウトマウスの作出により、SSCの正確な生理的役割を検討することができる。加えてこの遺伝子は、皮膚および他の多層化された上皮の疾患の特徴決定における新規マーカーとして利用され得る。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0011】

本発明は、基底層上層の分化した表皮層で発現する新規分泌タンパク質、および該タン

パク質をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のタンパク質は、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与するものと考えられる。

#### 【0012】

本発明の同定された2種の新規タンパク質は、本発明者らによって「dermokine- $\alpha$ 」、および「dermokine- $\beta$ 」と命名された。マウスdermokine- $\alpha$  遺伝子の塩基配列を配列番号：1に、該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に記載する。また、マウスdermokine- $\beta$  遺伝子の塩基配列を配列番号：3に、該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4に記載する。また、ヒトdermokine- $\alpha$  遺伝子の塩基配列を配列番号：5に、該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：6に記載する。さらに、ヒトdermokine- $\beta$  遺伝子の塩基配列を配列番号：7に、該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：8に記載する。

#### 【0013】

本発明はまず、下記(a)～(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドを提供する。

(a) 配列番号：2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(b) 配列番号：1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

(c) 配列番号：2、4、6または8に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号：1、3、5または7に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

#### 【0014】

本発明の好ましい態様においては、上記(c)または(d)は、以下のポリヌクレオチドである。

(c) 配列番号：2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号：1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

当業者においては、任意のポリペプチドに対し、上記(c)または(d)の「ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」を有するか否かについて、適宜、判定を行うことができる。例えば、被検ポリペプチドをケラチノサイトへ導入し、重層上皮の分化マーカー、好ましくはインボルクリンの発現を指標として、判定することができる。例えば、上記インボルクリンの発現が上昇する場合、被検ポリペプチドは、「ケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」を有するものと判定される。

さらに、本発明の好ましい態様においては、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与する遺伝子であって、分泌タンパク質をコードする上記(a)～(d)のいずれかに記載のポリヌクレオチドである。

#### 【0015】

本発明は、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド、および該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。ここで「機能的に同等」とは、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチド（例えば、配列番号：2、4、6または8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド）と同等の生物学的機能（活性）を有していることを意味する。



本発明のポリヌクレオチドが持つ生物学的機能（活性）としては、例えば、基底層上層の分化した表皮層で発現すること、または、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与すること等を挙げることができる。例えば、ケラチノサイトの分化誘導活性を挙げることができる。これら以外にも本発明にdermokine- $\alpha$  / - $\beta$  に関して、後述の実施例に記載された機能（活性）を挙げることができる。

#### 【0016】

従って本発明には、配列番号：2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、基底層上層の分化した表皮層で発現する、または、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。さらに、配列番号：1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、基底層上層の分化した表皮層で発現する、または、ケラチノサイトの分化および／または増殖に関与するタンパク質をコードするポリヌクレオチドも本発明に含まれる。また、本発明のこれらポリヌクレオチドは、分泌タンパク質であることが好ましい。

#### 【0017】

被検ポリペプチド（タンパク質）について、分泌タンパク質であるか否かは、当業者においては、公知の方法により評価することができる。例えば、被検タンパク質へSEAP (secreted alkaline phosphatase) (His)<sub>6</sub> タグを付けた融合タンパク質を発現するベクターを作製し、該ベクターを細胞へトランスフェクションする。抗His抗体によるイムノブロッキングによって、該細胞培地へ被検タンパク質が分泌されるか否かを検討することができる。より詳細には、後述の実施例に記載の方法によって実施することができる。

#### 【0018】

また、被検ポリペプチド（被検遺伝子）が基底層上層の分化した表皮層で発現しているか否かは、当業者においては、公知の方法、例えば、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法、またはin situハイブリダイゼーション法等により適宜、実施することができる。また、被検ポリペプチド（被検遺伝子）が、ケラチノサイトに分化および／または増殖に関与しているか否かは、例えば、高Ca<sup>2+</sup>濃度または高細胞密度の条件下における被検ポリペプチド（遺伝子）の発現解析によって、検討することができる。より詳細には、後述の実施例に記載の方法によって適宜、実施することができる。

#### 【0019】

本発明の上記ポリヌクレオチドは、当業者においては、一般的に公知の方法により単離することが可能である。例えば、ハイブリダイゼーション技術 (Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350., Saiki, RK. et al., Science 1988, 239, 487.) を利用する方法が挙げられる。すなわち、配列番号：1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドもしくはその一部をプローブとして、また配列番号：1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、所望の動物から配列番号：1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドと高い相同性を有するポリヌクレオチドを単離することは、当業者にとって通常行い得ることである。このように、ハイブリダイゼーション技術やPCR技術によって単離し得る、配列番号：1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明のポリヌクレオチドに含まれる。このようなポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：1、3、5または7に示される塩基配列からなる遺伝子の、マウスまたはヒト以外の生物におけるホモログ等を挙げることができる。

#### 【0020】

上記ポリヌクレオチドを単離するためには、好ましくはストリンジントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明においてストリンジントなハイブリダイゼーション条件とは、6M 尿素、0.4% SDS、0.5×SSCの条件またはこれと同等のストリンジ

ンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4% SDS、0.1×SSCの条件下では、より相同性の高いポリヌクレオチドを単離できることが期待される。こうして単離されたポリヌクレオチドは、アミノ酸レベルにおいて、配列番号：2、4、6または8に記載のアミノ酸配列と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を指す。

#### 【0021】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 2264-2268., Karlin, S. & Altschul, SF., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873.) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul, SF. et al., J Mol Biol, 1990, 215, 403.)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

#### 【0022】

本発明のポリヌクレオチドには、ゲノムDNA、cDNAおよび化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段により行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、本発明のポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1、3、5または7に記載の塩基配列）を有する生物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミク 라이브러리（ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PACなどが利用できる）を作製し、これを展開して、本発明のポリヌクレオチドを基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことで調製できる。また、本発明のポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1、3、5または7）に特異的なプライマーを作製し、これを利用したPCRを行って調製することも可能である。cDNAは、例えば、本発明のポリヌクレオチドを有する生物から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをλZAPなどのベクターに挿入してcDNA 라이브러리を作製し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことで、またPCRを行うことにより調製できる。

#### 【0023】

また、本発明は、配列番号：2、4、6または8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と構造的に類似しているタンパク質をコードするポリヌクレオチドも提供する。このようなポリヌクレオチドとしては、該タンパク質において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。上記タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内であると考えられる。より具体的には、アミノ酸の変異数は、通常50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、より好ましくは10アミノ酸以内であり、最も好ましくは3アミノ酸以内である。

#### 【0024】

上記ポリヌクレオチドを調製するために、当業者によく知られた方法としては、上記したハイブリダイゼーション技術やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術の他に、例えば、該ポリヌクレオチドに対し、site-directed mutagenesis法 (Kramer, W. & Fritz, HJ., Methods Enzymol, 1987, 154, 350.) により変異を導入する方法が挙げられる。また、自然界においても、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは起こり得ることである。また、塩基配列が変異していても、その変異がタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合（縮重変異）があり、このような縮重変異ポリヌクレオ



チドも本発明に含まれる。

#### 【0025】

本発明は、また、本発明のポリペプチドの断片を提供する。こうした断片は全体的に前記本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の一部と同一であるが、全部とは同一でないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。本発明のポリペプチド断片は、通常、8アミノ酸残基以上、好ましくは12アミノ酸残基以上（例えば、15アミノ酸残基以上）の配列からなるポリペプチド断片である。好適な断片としては、例えば、アミノ末端を含む一連の残基もしくはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失、またはアミノ末端を含む一連の残基とカルボキシル末端を含む一連の残基の二連の残基の欠失したアミノ酸配列を有するトランケーション(truncation)ポリペプチドが含まれる。また、 $\alpha$ ヘリックスと $\alpha$ ヘリックス形成領域、 $\beta$ シートと $\beta$ シート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、 $\alpha$ 両親媒性領域、 $\beta$ 両親媒性領域、可変性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含む断片のような、構造的または機能的特性により特徴づけられる断片も好適である。特定された配列および断片の変異型も本発明の一部を構成する。好適な変異型は、同類アミノ酸の置換を伴うものである。即ち、ある残基が同様の性質の他の残基で置換されているものである。典型的なこうした置換は、例えば、Ala, Val, LeuとIleの間、SerとThrの間、酸性残基 AspとGluの間、AsnとGlnの間、塩基性残基 LysとArgの間、または芳香族残基 PheとTyrの間で起こる。

また、本発明の上記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドもまた本発明に含まれる。

#### 【0026】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドが挿入されたベクター、本発明のポリヌクレオチドまたは該ベクターを保持する宿主細胞、および該宿主細胞を利用した本発明のポリペプチドの製造方法を提供する。

本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製)などが好ましい。本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター（プロメガ社製）、大腸菌であればpETベクター（Invitrogen社製）、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であればpME18Sベクター（Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)）などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11）。

#### 【0027】

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ポリペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞（例：ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌）、真菌細胞（例：酵母、アスペルギルス）、昆虫細胞（例：ドロソフィラS2、スポドプテラSF9）、動物細胞（例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞）および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9）、リポフェクタミン法（GIBCO-BRL社製）、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

#### 【0028】

宿主細胞において発現したポリペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むこと

ができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

#### 【0029】

本発明のポリペプチドの回収は、本発明のポリペプチドが培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のポリペプチドが細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後ポリペプチドを回収する。

組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

#### 【0030】

また本発明者らは、本発明のdermokine- $\alpha$  遺伝子およびdermokine- $\beta$  遺伝子が、ケラチノサイト分化関連タンパク質(Kdap)をコードする遺伝子、およびsuprabasin (スプラバシン) 遺伝子との間に位置することを見出した。さらに、これら4種の遺伝子は分泌タンパク質であり、重層化の開始時に発現される遺伝子複合体(遺伝子クラスター)であることを見出した。即ち、上記4種の遺伝子は共通の遺伝子発現調節下にあり、遺伝子複合体を構成している。本発明者らは該遺伝子複合体をSSCと命名した。

#### 【0031】

本発明は、共通の遺伝子発現調節下にあることを特徴とする遺伝子複合体であって、(1) Kdap遺伝子、(2) dermokine- $\alpha$  遺伝子、(3) dermokine- $\beta$  遺伝子、および(4) suprabasin遺伝子の各遺伝子から構成されるケラチノサイトの分化または増殖に参与する遺伝子複合体を提供する。

#### 【0032】

本発明の上記遺伝子複合体は、例えば、図3で示すように、マウスにおいては7番染色体上に、ヒトにおいては19番染色体上に位置している。当業者においては、図3で示される情報を基に、本発明の遺伝子複合体の正確な位置、および配列についての情報を、適宜、公共のデータベース、市販の解析ツール等を利用して、取得することが可能である。

本発明の上記遺伝子複合体とは、好ましくは、上記(1)～(4)の遺伝子を含む、ゲノムDNA断片であり、該遺伝子の共通の発現調節領域を含むことが望ましい。該ゲノムDNA断片は、好ましくは、単離・精製されたDNA断片である。また、該DNA断片は、マウス、またはヒト由来であることが好ましい。

また、好ましい態様においては、本発明の上記ゲノムDNA断片は、特に制限されるものではないが、40 kbp (程度)の長さのDNA断片である。

#### 【0033】

本発明は、本発明者のポリヌクレオチド(例えば、配列番号: 1、3、5または7のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその相補鎖)に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T (ただしRNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15～100ヌクレオチド、好ましくは15～35ヌクレオチドの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドの鎖長のポリヌクレオチドが用いられる。このようなポリヌクレオチドは、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズ



するものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントな条件下で、本発明のポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1、3、5または7）とハイブリダイズし、他のポリペプチドをコードするDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。

#### 【0034】

また、上記ポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドが含まれる。このようなポリヌクレオチドには、アンチセンスポリヌクレオチド（アンチセンスDNA/RNA；本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンスRNA、および該RNAをコードするDNA）やリボザイム（本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA）が含まれる。

#### 【0035】

アンチセンスポリヌクレオチドが標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつくられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する（平島および井上「新化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現」，日本生化学会編，東京化学同人，pp. 319-347, 1993）。

#### 【0036】

本発明で用いられるアンチセンス核酸（ポリヌクレオチド）は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的と考えられる。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドも、本発明で利用されるアンチセンスポリヌクレオチドに含まれる。使用されるアンチセンスポリヌクレオチドは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。アンチセンスポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスポリヌクレオチドは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15ヌクレオチド以上、好ましくは100ヌクレオチド、さらに好ましくは500ヌクレオチド以上の鎖長を有し、通常、3000ヌクレオチド以内、好ましくは2000ヌクレオチド以内の鎖長を有する。

#### 【0037】

該アンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1、3、5または7）の配列情報を基にホスホロチオネート法（Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)）などにより調製することが可能である。

#### 【0038】

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードする核酸（ポリヌクレオチド

）を利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるMIRNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191)。

#### 【0039】

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている(M.Koizumiら, (1988) FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である(M.Koizumiら, (1988) FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191、M.Koizumiら, (1989) Nucleic Acids Res. 17:7059)。

#### 【0040】

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349, 1986)。このリボザイムも、標的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi およびN.Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19:6751、菊池洋, (1992) 化学と生物 30:112)。

#### 【0041】

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

#### 【0042】

本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。ここで「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFabフラグメントが含まれる。

#### 【0043】

本発明のポリペプチドまたはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。抗体は、好ましくは、本発明のポリペプチドに免疫特異的である。「免疫特異的」とは、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

#### 【0044】

本発明のポリペプチドに結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはそのGSTとの融合タンパク質をウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティークラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、本発明のポリペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞(ハイブリドーマ)の中から、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリ



ドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで、調製することが可能である。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドやこれを発現する細胞の単離、同定、および精製に利用することができる。

本発明者らは、本発明のヒトdermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdap、Suprabasinの各タンパク質に対する抗体（ポリクローナル抗体）を、実際に作製することに成功した。本発明の抗体の一例として、後述の実施例に示されるヒトdermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdap、またはSuprabasinに対する抗体を挙げることができる。

#### 【0045】

また、本発明者らによって見出された知見により、dermokineノックアウトマウスを作製することが可能である。該ノックアウト動物（非ヒト動物）は、SSCの生理的役割の検討に非常に有用である。

即ち本発明は、本発明の遺伝子（例えば、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ ）の発現が人為的に抑制されている動物（非ヒト動物）に関する。

上記の「遺伝子の発現が人為的に抑制されている」とは、通常、遺伝子対の一方または双方に、ヌクレオチドの挿入、欠失、置換等の遺伝子変異を有することにより該遺伝子の発現が抑制されている状態を指す。正常なタンパク質としての機能が減少または喪失している変異タンパク質が発現している場合も、この「遺伝子の発現の抑制」に含まれる。上記「抑制」には、遺伝子の発現が完全に抑制されている場合のほか、該遺伝子の遺伝子対の一方の遺伝子の発現のみが抑制されている場合も含まれる。

本発明において遺伝子の改変の対象となる動物は、通常、ヒト以外の動物であり、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ等のげっ歯類であり、その中でも特にマウスが好ましい。本発明において遺伝子の改変の対象となるES細胞もまた、げっ歯類に由来するものが好ましく、特にマウス由来が好ましい。なお、一般的に称される「ノックアウト動物」も本発明の遺伝子改変動物に含まれる。

#### 【0046】

本発明の遺伝子改変非ヒト動物（単に、「遺伝子改変動物」と記載する場合あり）において、遺伝子の発現を人為的に抑制する手段としては、遺伝子全体またはその一部を欠損させる方法や遺伝子の発現制御領域の全部またはその一部を欠損させる方法等を例示することができるが、好ましくは遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子を挿入することにより遺伝子を不活性化する方法である。即ち、本発明の好ましい態様において、遺伝子改変動物は、遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子が挿入されていることを特徴とする。

#### 【0047】

本発明の遺伝子改変動物は、当業者においては一般的に公知の遺伝子工学技術により作製することができる。例えば、以下のようにして遺伝子改変マウスを作製することができる。まず、マウスから本発明の遺伝子（例えば、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ ）のエクソン部分を含むDNAを単離し、このDNA断片に適当なマーカー遺伝子を挿入し、ターゲッティングベクターを構築する。このターゲッティングベクターをエレクトロポレーション法などによりマウスのES細胞株に導入し、相同組み換えを生じた細胞株を選抜する。挿入するマーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子が好ましい。抗生物質耐性遺伝子を挿入した場合には、抗生物質を含む培地で培養するだけで相同組み換えを生じた細胞株を選抜することができる。また、より効率的な選抜を行うためには、ターゲッティングベクターにチミジンキナーゼ遺伝子などを結合させておくことも可能である。これにより、非相同組み換えを起こした細胞株を排除することができる。また、PCRおよびサザンブロットにより相同組み換え体の検定を行い、本発明の遺伝子の遺伝子対の一方が不活性化された細胞株を効率よく得ることもできる。

#### 【0048】

相同組み換えを生じた細胞株を選抜する場合、相同組み換え箇所以外にも、遺伝子挿入

による未知の遺伝子破壊の恐れがあることから、複数のクローンを用いてキメラ作製を行うことが好ましい。得られたES細胞株をマウス胚盤葉にインジェクションしキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスを交配させることで、本発明の遺伝子の遺伝子対の一方を不活性化したマウスを得ることができる。さらに、このマウスを交配させることで、本発明の遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したマウスを取得することができる。より具体的には、後述の実施例に記載の方法に従って、本発明の遺伝子改変マウスを作製することが可能である。マウス以外のES細胞が樹立された動物においても、同様の手法により、遺伝子改変を行うことができる。

#### 【0049】

また、本発明の遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したES細胞株は、以下の方法により取得することも可能である。すなわち、遺伝子対の一方を不活性化したES細胞株を高濃度の抗生物質を含む培地で培養することにより、遺伝子対のもう一方も不活性化された細胞株、即ち、本発明の遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したES細胞株を得ることができる。また、遺伝子対の一方を不活性化したES細胞株を選抜し、この細胞株に再度ターゲティングベクターを導入し、相同組換えを生じた細胞株を選択することでも作製することができる。ターゲティングベクターに挿入するマーカー遺伝子は、前出のマーカー遺伝子とは異なるものを使用することが好ましい。

#### 【0050】

また本発明は、本発明の遺伝子改変非ヒト動物から樹立された細胞株を提供する。本発明の遺伝子改変動物由来の細胞株を樹立する方法としては、公知の方法を利用することができる。例えば、げっ歯類においては、胎仔細胞の初代培養の方法を用いることが可能である。（新生化学実験講座、18巻、125頁～129頁、東京化学同人、およびマウス胚の操作マニュアル、262頁～264頁、近代出版）。

#### 【0051】

本発明の遺伝子改変動物、該動物から樹立した細胞株、およびES細胞株は、本発明の遺伝子の詳細な機能の解析に利用することができる。さらに、本発明の遺伝子改変動物は、本発明のタンパク質の機能を代替する化合物のスクリーニング方法等に利用することが可能である。

#### 【0052】

また、本発明の上記ポリペプチド（タンパク質）は、ケラチノサイト分化誘導作用を有することが期待される。従って本発明は、本発明の上記ポリペプチド（タンパク質）を有効成分として含む、ケラチノサイト分化誘導剤（本明細書においては、「分化誘導剤」と記載する場合あり）に関する。

好ましい態様において本発明は、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質を有効成分として含むケラチノサイト分化誘導剤を提供する。上記dermokine- $\alpha$  タンパク質としては、例えば、配列番号：2または6に記載のポリペプチドを挙げることができる。また、上記dermokine- $\beta$  タンパク質としては、例えば、配列番号：4または8に記載のポリペプチドを示すことができる。

また、本発明の分化誘導剤の成分である上記ポリペプチドをコードするDNAもまた、本発明に含まれる。

#### 【0053】

また本発明は、SSCあるいはdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現活性化物質を含む、ケラチノサイト分化誘導剤に関する。

本発明における「タンパク質の発現活性化物質」は、タンパク質の発現を有意に活性化（上昇）させる物質（化合物）である。本発明の上記「発現活性化」には、該タンパク質をコードする遺伝子の転写活性化、および／または該遺伝子の転写産物からの翻訳活性化が含まれる。

本発明のSSCもしくはdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現活性化物質としては、例えば、SSCもしくはdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の転写調節領域（例えば、プロモーター領域）に結合して、該遺伝子の転写を促進する物質（転写活性化因子等）を挙げることができる。



また、本発明においてSSCもしくはdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現活性の測定は、当業者においては周知の方法、例えば、RT-PCR法、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法等により、容易に実施することができる。

#### 【0054】

また、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質（本明細書においては、これら2つのタンパク質（遺伝子）を合わせて「dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質（遺伝子）」と記載する場合あり）の発現または機能を抑制する物質（化合物）は、ケラチノサイト分化抑制作用を有することが期待される。従って本発明は、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現もしくは機能阻害物質（化合物）を有効成分として含む、ケラチノサイト分化抑制剤（本明細書においては、「分化抑制剤」と記載する場合あり）に関する。

本発明における「発現阻害物質」は、タンパク質の発現を有意に低下させる、あるいは、発現を完全に抑制させる物質（化合物）である。本発明の上記「発現阻害」には、該タンパク質をコードする遺伝子の転写阻害、および／または該遺伝子の転写産物からの翻訳阻害が含まれる。

#### 【0055】

上記分化抑制剤の好ましい態様としては、以下の（a）～（d）からなる群より選択される化合物を有効成分として含む薬剤である。

- （a）dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の転写産物またはその一部に対するアンチセンス核酸
- （b）dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する核酸
- （c）dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子の発現をRNAi効果による阻害作用を有する核酸
- （d）dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質と結合する抗体（抗dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質抗体）

#### 【0056】

本発明の上記薬剤における核酸としては、例えば、上述のアンチセンス核酸、およびリボザイム活性を有する核酸を好適に示すことができる。また、内在性遺伝子の発現の阻害は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖RNAを用いたRNA干渉（RNA interference; RNAi）によっても行うことができる。RNAiとは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNAを細胞内に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも阻害される現象のことを指す。RNAiの機構の詳細は明らかではないが、最初に導入した二本鎖RNAが小片に分解され、何らかの形で標的遺伝子の指標となることにより、標的遺伝子が分解されると考えられている。RNAiに用いるRNAは、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  遺伝子もしくは該遺伝子の部分領域と完全に同一である必要はないが、完全な相同性を有することが好ましい。

#### 【0057】

また、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の機能阻害物質としては、本発明の上記抗体、例えば、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質に結合する抗体（dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質を認識する抗体； 抗dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質抗体）を挙げることができる。該抗体は、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質と結合することにより、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の機能を阻害し、その結果、ケラチノサイトの分化が誘導されることが期待される。本発明の上記抗体は、特に制限されないが、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  以外のタンパク質とは結合せず、特異的にdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質と結合する（dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質を認識する）抗体であることが好ましい。

#### 【0058】

本発明のdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質に結合する抗体は、例えば、ケラチノサイトの分化抑制を目的とした使用が考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

本発明のケラチノサイト分化誘導剤は、ケラチノサイトの分化異常（分化誘導の低下）に起因する疾患の治療薬となることが期待される。該疾患としては、例えば、不全角化を

伴う尋常性乾癬、日光角化症等を挙げることができる。

#### 【0059】

また、本発明のケラチノサイト分化抑制剤は、ケラチノサイトの分化亢進に起因する疾患の治療薬となることが期待される。該疾患としては、例えば、過角化を伴う尋常性魚鱗癬、伴性遺伝性魚鱗癬、尋常性疣贅、アミロイド苔癬及び顆粒層肥厚を伴う扁平苔癬、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症等の皮膚疾患を挙げることができる。

#### 【0060】

本発明のケラチノサイト分化誘導剤またはケラチノサイト分化抑制剤（本明細書においては、双方をまとめて「薬剤」と記載する場合あり）は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合し、医薬組成物として経口、あるいは非経口的に投与することができる。経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型とすることができる。非経口剤としては、注射剤、点滴剤、外用薬剤、あるいは座剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。外用薬剤には、経鼻投与剤、あるいは軟膏剤等を示すことができる。主成分である本発明の分化誘導剤を含むように、上記の剤型とする製剤技術は公知である。

#### 【0061】

例えば、経口投与用の錠剤は、本発明の薬剤に賦形剤、崩壊剤、結合剤、および滑沢剤等を加えて混合し、圧縮整形することにより製造することができる。賦形剤には、乳糖、デンプン、あるいはマンニトール等が一般に用いられる。崩壊剤としては、炭酸カルシウムやカルボキシメチルセルロースカルシウム等が一般に用いられる。結合剤には、アラビウム、カルボキシメチルセルロース、あるいはポリビニルピロリドンが用いられる。滑沢剤としては、タルクやステアリン酸マグネシウム等が公知である。

#### 【0062】

本発明の薬剤を含む錠剤は、マスキングや、腸溶性製剤とするために、公知のコートイングを施すことができる。コートイング剤には、エチルセルロースやポリオキシエチレングリコール等を用いることができる。

#### 【0063】

また注射剤は、主成分である本発明の薬剤を適当な分散剤とともに溶解、分散媒に溶解、あるいは分散させることにより得ることができる。分散媒の選択により、水性溶剤と油性溶剤のいずれの剤型とすることもできる。水性溶剤とするには、蒸留水、生理食塩水、あるいはリンゲル液等を分散媒とする。油性溶剤では、各種植物油やプロピレングリコール等を分散媒に利用する。このとき、必要に応じてパラベン等の保存剤を添加することもできる。また注射剤中には、塩化ナトリウムやブドウ糖等の公知の等張化剤を加えることができる。更に、塩化ベンザルコニウムや塩酸プロカインのような無痛化剤を添加することができる。

#### 【0064】

本発明の薬剤は、固形、液状、あるいは半固形状の組成物とすることにより外用剤とすることができる。固形、あるいは液状の組成物については、先に述べたものと同様の組成物とすることで外用剤とすることができる。半固形状の組成物は、適当な溶剤に必要な応じて増粘剤を加えて調製することができる。溶剤には、水、エチルアルコール、あるいはポリエチレングリコール等を用いることができる。増粘剤には、一般にベントナイト、ポリビニルアルコール、アクリル酸、メタクリル酸、あるいはポリビニルピロリドン等が用いられる。この組成物には、塩化ベンザルコニウム等の保存剤を加えることができる。また、担体としてカカオ脂のような油性基材、あるいはセルロース誘導体のような水性ゲル基材を組み合わせるにより、座剤とすることもできる。

#### 【0065】

本発明の薬剤は、安全とされている投与量の範囲内において、ヒトを含む哺乳動物に対して、必要量が投与される。本発明の薬剤の投与量は、剤型の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状等を考慮して、最終的には医師または獣医師の判断により適宜決定



することができる。

#### 【0066】

また、本発明の薬剤（ケラチノサイト分化誘導剤・抑制剤）は、上述の疾患以外にも、例えば、乾燥皮膚、ふけ、にきび、角化症、湿疹、皮膚のはがれ、そう痒症、老人斑、ほくろ、黒皮症、しわ、いぼ、皮膚の斑点、過色素沈着皮膚、過角化性皮膚、炎症性皮膚、年齢関連皮膚変化、等の表皮の異常な生物学的症状もしくは傷害に対して、治療もしくは予防効果を有することが期待される。本発明の薬剤は、通常、ヒトに対して使用されるが、例えば、イヌ、ネコ等の皮膚疾患に対して用いることも可能である。

#### 【0067】

また本発明は、ケラチノサイト分化誘導剤（分化誘導作用を有する化合物）のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の好ましい態様においては、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の発現量または活性を指標とする方法である。即ち、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の発現もしくは活性を上昇させる化合物は、ケラチノサイト分化誘導作用を有することが期待される。

#### 【0068】

本発明の上記方法においては、まず、dermokine- $\alpha$ および/または $\beta$ タンパク質（遺伝子）を発現する細胞に被検化合物を接触させる。

本方法に用いる「細胞」は、特に制限されないが、好ましくはヒト由来の細胞である。「dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質を発現する細胞」としては、内因性のdermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質を発現している細胞、または外来性のdermokine- $\alpha$ / $\beta$ 遺伝子が導入され、該遺伝子が発現している細胞を利用することができる。外来性のdermokine- $\alpha$ / $\beta$ 遺伝子が発現した細胞は、通常、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ 遺伝子が挿入された発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより作製することができる。該発現ベクターは、一般的な遺伝子工学技術によって作製することができる。

#### 【0069】

本発明のスクリーニング方法に供する被検化合物としては、特に制限はない。例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物等が挙げられるが、これらに限定されない。

また、これらの被検化合物は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることができる。

#### 【0070】

dermokine- $\alpha$ / $\beta$ 遺伝子を発現する細胞への被検化合物の「接触」は、通常、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ 遺伝子が発現する細胞の培養液に被検化合物を添加することによって行うが、この方法に限定されない。被検化合物がタンパク質等の場合には、該タンパク質を発現するDNAベクターを、該細胞へ導入することにより、「接触」を行うことができる。

#### 【0071】

本方法においては、次いで、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質を発現する細胞におけるdermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の発現量または活性を測定する。発現量の測定は、当業者が簡便に行い得るものであり、一般的な方法、例えばノーザンブロット法、ウェスタンブロット法等により適宜実施することが可能である。例えば、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質を発現する細胞に接触させた被検化合物に付した標識を指標にして測定することも可能である。

#### 【0072】

尚、本発明において「発現」とは、タンパク質をコードする遺伝子からの転写（mRNAの生成）、または該遺伝子の転写産物からの翻訳のいずれの場合をも意味する。

また、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の活性を指標にして上記スクリーニング方法を実施する場合には、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の上述の機能（活性）、例えば、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質のケラチノサイトの分化誘導活性を指標とすることができる。dermokine-



e- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の活性の測定は、当業者においては、公知の方法によって適宜実施することができる。

本発明の方法において、上記「活性」としては、好ましくは、上述の「dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質をケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」を挙げることができる。

#### 【0073】

本方法においては、次いで、被検化合物を接触させない場合と比較して、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の発現量または活性を上昇させる化合物を選択する。

上記スクリーニング方法によって取得される化合物は、例えば、ケラチノサイトの分化異常に起因する疾患の治療薬となることが期待される。

#### 【0074】

また本発明は、ケラチノサイト分化抑制剤（分化誘導作用を有する化合物）のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の好ましい態様においては、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の発現量または活性を指標とする方法である。即ち、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の発現もしくは活性を低下（阻害）させる化合物は、ケラチノサイト分化抑制作用を有することが期待される。

#### 【0075】

本発明の上記方法においては、上述の分化誘導剤のスクリーニング方法に倣って、適宜、実施することができる。即ち、本発明の上記方法においては、まず、dermokine- $\alpha$ および/または $\beta$ タンパク質（遺伝子）を発現する細胞に被検化合物を接触させる。次いで、被検化合物を接触させない場合と比較して、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質の発現量または活性を低下させる化合物を選択する。

#### 【0076】

上記スクリーニング方法によって取得される化合物は、例えば、ケラチノサイトの分化亢進に起因する疾患の治療薬となることが期待される。

本発明の上記スクリーニング方法の好ましい態様としては、上記の「dermokine- $\alpha$ / $\beta$ タンパク質をケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」を指標とするスクリーニング方法である。

即ち本発明は、以下の工程（a）～（c）を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法に関する。

（a）dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質を発現するケラチノサイトと、被検化合物を接触させる工程

（b）前記dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質の、ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を測定する工程

（c）被検化合物を接触させない場合と比較して、前記活性を上昇させる化合物を選択する工程

また本発明は、以下の工程（a）～（c）を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法を提供する。

（a）dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質を発現するケラチノサイトと、被検化合物を接触させる工程

（b）前記dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質の、ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性を測定する工程

（c）被検化合物を接触させない場合と比較して、前記活性を低下させる化合物を選択する工程

また、本発明の別の態様としては、以下の工程（a）～（c）を含む、ケラチノサイト分化誘導剤のスクリーニング方法である。

（a）dermokine- $\alpha$ タンパク質もしくはdermokine- $\beta$ タンパク質、またはそれらが発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

（b）ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を上昇させる化合物を選択する工程

さらに本発明の別の態様においては、以下の工程 (a) ~ (c) を含む、ケラチノサイト分化抑制剤のスクリーニング方法に関する。

(a) dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質、またはそれらを発現する細胞と、ケラチノサイト及び被検化合物を共存させる工程

(b) ケラチノサイトの重層上皮細胞への分化を測定する工程

(c) 被検化合物を共存させない場合と比較して、重層上皮細胞への分化を低下させる化合物を選択する工程

上記工程 (a) におけるdermokine- $\alpha$  / - $\beta$  タンパク質を発現する細胞は、ケラチノサイトと一緒に培養できればいかなる細胞でも許され、ケラチノサイトそのものであっても良い。好ましくはケラチノサイトである。dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  タンパク質を発現する細胞は、通常、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質をコードするDNAを発現可能な状態で保持するベクター (dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  発現ベクター) を、ケラチノサイトへ導入することにより、作製することができる。

また、上記工程 (b) における「dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質をケラチノサイトに発現させることにより該ケラチノサイトを重層上皮細胞へ分化させる活性」は、例えば、重層上皮の分化マーカー、好ましくは、インボルクリンの発現を指標として、適宜、測定することができる。例えば、上記インボルクリンの発現を上昇させる化合物は、ケラチノサイト分化誘導作用を有するものと判定され、インボルクリンの発現を低下させる化合物は、ケラチノサイト分化抑制作用を有するものと判定される。

#### 【0077】

また本発明のdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質は、重層上皮において発現していることから、例えば、重層上皮から派生した癌細胞のマーカーとなることが期待される。本発明のdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現もしくは活性の有無を指標とすることにより、所望の癌細胞について、重層上皮から派生した癌細胞であるか否かの判定を行うことが可能である。本発明は、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現もしくは活性の有無を指標とする、被検細胞について、重層上皮から派生した癌細胞であるか否かの検査方法を提供する。

#### 【0078】

本発明の上記検査方法の好ましい態様においては、以下の工程 (a) および (b) を含む方法である。

(a) 被検細胞について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程、

(b) 対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検細胞は重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定する工程

#### 【0079】

上記工程 (a) における「測定」は、上述の方法によって、適宜実施することができる。また、上記工程 (b) における「対照」とは、通常、正常細胞を指す。具体的には、癌細胞ではないことが予め判明している細胞であり、一般的には、健常者由来の細胞である。また、重層上皮から派生した癌細胞ではないことが予め判明している癌細胞を、上記「対照」として用いることも可能である。

本発明の上記工程 (b) においては、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  の発現もしくは活性が、対照と比較して変化している細胞は、重層上皮から派生した癌細胞、例えば扁平上皮癌細胞であるものと判定することができる。

#### 【0080】

本発明において上記「変化」とは、通常、「上昇」および「減少」を意味するが、好ましくは「減少」を指す。従って、本発明の好ましい態様においては、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  の発現もしくは活性が、対照と比較して減少している細胞は、重層上皮から派生した癌細胞、例えば扁平上皮癌細胞であるものと判定することができる。

#### 【0081】

本発明のタンパク質は、重層上皮から派生する増殖、分化異常疾患に関与することが考えられる。例えば、皮膚癌、食道癌、子宮頸癌、肺癌、胸腺癌等は、重層扁平上皮（肺癌の場合は、偽重層上皮）から派生した扁平上皮癌や基底細胞癌が良く認められる。本発明のタンパク質（遺伝子）は、これらの癌において癌の進行度または分化度に関与していることが予測され、即ち、これらの癌のマーカーとして有用である。本発明においては、上記「重層上皮から派生した癌細胞」とは、好ましくは、上述の癌の細胞を指す。特に、元々重層扁平上皮ではない肺の気管支（偽重層上皮）の扁平上皮癌には、本発明の上記方法は有効である。

#### 【0082】

また、上記検査方法を用いて、被検者について、扁平上皮癌もしくは基底細胞癌に罹患しているか否かの診断を行うことが可能である。即ち、本発明は、以下の工程（a）および（b）を含む、被検者について、扁平上皮癌または基底細胞癌の診断方法に関する。

（a）被検者から調製された細胞試料について、本発明の上記検査方法により、重層上皮から派生した癌細胞か否かを判定する工程

（b）前記工程により、重層上皮から派生した癌細胞であるものと判定された場合に、被検者は、扁平上皮癌または基底細胞癌に罹患しているものと判定する工程

#### 【0083】

また本発明は、血液等の体液を被検試料として上記検査（診断）方法を行うことが可能である。本発明のタンパク質は、分泌タンパク質であることから、特に、血中に本発明のタンパク質が分泌された場合には、重層上皮から派生する癌、例えば、食道癌、または肺癌等の診断を適宜、実施することが可能である。

#### 【0084】

また、本発明のタンパク質は、種々の皮膚疾患に関与することが考えられる。例えば、表皮のターンオーバーが亢進している乾癬等の病態においては、その基底層が著しく増大し、増殖が亢進し、錯角化等が起こっている。また、扁平苔癬等においては、錯角化を伴わない角質肥厚や顆粒層の肥厚が認められる。上記のような分化、増殖異常に起因する疾患にも、本発明のタンパク質（例えば、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ ）が関与していることが考えられる。

#### 【0085】

本発明は、以下の工程（a）および（b）を含む、被検者について、皮膚疾患の診断方法を提供する。

（a）被検者から調製された被検試料について、dermokine- $\alpha$  タンパク質もしくはdermokine- $\beta$  タンパク質の発現量または活性を測定する工程

（b）対照と比較して、前記発現量または活性が変化している場合に、被検者は皮膚疾患に罹患しているものと判定する工程

#### 【0086】

上記方法においては、工程（b）における発現量もしくは活性が上昇している場合に、dermokine- $\alpha$ / $\beta$  の発現もしくは活性の亢進に伴う皮膚疾患に罹患しているものと判定される。一方、発現量もしくは活性が低下している場合に、dermokine- $\alpha$ / $\beta$  の発現もしくは活性の低下に伴う皮膚疾患に罹患しているものと判定される。

#### 【0087】

上記「皮膚疾患」とは、通常、dermokine- $\alpha$ / $\beta$  タンパク質の発現もしくは活性の「変化」に伴う（起因する）疾患を言う。より具体的には、皮膚疾患として、乾癬、扁平苔癬、角化症、湿疹、そう痒症、黒皮症、炎症性皮膚炎等を挙げることができる。

#### 【0088】

また上記診断方法に供することができる生体試料として、例えば、被検者の皮膚組織（細胞）等を挙げることができるが、被検者由来の細胞もしくは細胞抽出物を含む試料であれば、特に制限されない。

また、本発明において被検者とは、通常、ヒトを指すが、本発明のタンパク質（例えば、dermokine- $\alpha$ / $\beta$ ）を有する生物であれば特に制限されない。例えば、イヌ、ネコ等の



動物について、本発明の検査・診断方法（例えば、皮膚疾患の診断方法）を実施すること  
も可能である。

#### 【0089】

なお、本発明においてdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質の発現もしくは活性の測定は、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  タンパク質を構成要素として含む複合体のSSCについて、その発現もしくは活性を測定することによっても実施することが可能である。

#### 【実施例】

#### 【0090】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### 【0091】

##### [細胞培養および抗体]

正常ヒト胚ケラチノサイト (NHEK) は、供給元 (KURABO, Osaka, Japan) による初代培養後に凍結細胞として購入した。NHEK細胞を無血清培地Humedia KG2 (KURABO) 中で培養した。293/EBNA-1細胞はInvitrogen社 (San Diego, CA) から購入し、10%ウシ胎仔血清を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Sigma) 中で維持した。抗His抗体 (Penta・His Antibody, BSA free) は QIAGEN (Valencia, CA) より購入した。

#### 【0092】

[マウス皮膚cDNAライブラリーの構築および均等化、ならびにDIG標識RNAプローブの調製]

cDNAライブラリーは、以前に記述された方法 (Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S: Anal. Biochem. 254:23-30, 1997) に従って構築および均等化した。簡潔に述べると、マウス背部皮膚 (8週齢雌Balb/cマウス) の全RNAから、NotI制限部位を用い、オリゴ<sub>2</sub> (dT) プライマーを用いてマウス皮膚cDNAを構築した。cDNAをPCRにより増幅した後に、以前に記載された方法に従って (Ko: Nucleic Acids Res. 18:5705-5711, 1990; Takahashi N, Ko MSH: Genomics 23:202-210, 1994)、均等化サイクルを2回行った。均等化の各段階 (E1およびE2) におけるCot値はそれぞれ10および100であった。

#### 【0093】

均等化の評価は定量的リアルタイムPCR分析によって、以下に記述されているように二重化して行なった。以下に示す各遺伝子特異的なプライマー対は、各cDNA配列であるNM016958、NM027011、NM008401およびNM008508より構築した：  
マウスケラチン14 (5' - GGACGCCCACCTTTCATCTTC-3' (配列番号：9) : 順方向、5' - ATCTGCGCGTTGGTGGAGG-3' (配列番号：10) : 逆方向、  
マウスケラチン5 (5' - CAGTTCTACATTTGTGTTGCACGTC-3' (配列番号：11) : 順方向、5' - TTGGACAGACTCTGGAGGAAGTCAG-3' (配列番号：12) : 逆方向)、  
マウスインテグリン $\alpha$ -M (5' - TTGAAAGGACCCCAGTGCTGAAGTGC-3' (配列番号：13) : 順方向、5' - ATGGAGCTGCCCACAATGAGTGGTACAG-3' (配列番号：14) : 逆方向)、および  
マウスロリクリン (5' - CCTACCTGGCCGTGCAAG-3' (配列番号：15) : 順方向、5' - CATGA GAAAGTTAAGCCCATCG-3' (配列番号：16) : 逆方向)。同じ量の、均等化したライブラリー (E1およびE2) およびスターティングライブラリー (E0) をPCR解析に利用した。全データは内部標準について標準化した (ロリクリン;  $\Delta$ Ct method, User Bulletin 2, Applied Biosystems)。

#### 【0094】

E2ライブラリーをNotIおよびSalIで消化し、得られた断片をpBlueScript KS(-) (Stratagene, La Jolla, CA) 中にクローニングした。コロニーを無作為に選択し、cDNA挿入物を、Native Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用い、ベクタープライマーの対を利用してPCRによって増幅した。増幅断片には、ベクターに由来するT3およびT7 RNAポリメラーゼプロモーター配列が追加される。アンチセンスプローブ (Stratagene) を作製するために、T7 RNAポリメラーゼを用いるcRNA転写をNunc MicroWell™ プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) において行った。センスプローブはT3 RNAポリメラーゼ (Stratagene) を

用いることによって作製した。

#### 【0095】

[ハイスループット in situ ハイブリダイゼーション (HT-ISH)]

96ウェルのプレートにおけるHT-ISHを以前に記述された通りに行った (Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S: Anal. Biochem. 254:23-30, 1997)。簡潔に述べると、成体マウス足蹠皮膚を8週齢の雌Balb/cマウスから新たに単離した。単離した皮膚をリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で1%ジエチルピロカルボネート (DEPC) により室温で1時間かけて固定した。それから試料を脱水し、包埋し、切片を作製し、マウントおよび96ウェルプレートにハイブリダイゼーションした。

#### 【0096】

[ノーザンブロット]

種々の成体マウス組織由来の全RNAを、ChomczynskiおよびSacchiにより記載された方法に従って調製した (Chomczynski P, Sacchi N: Anal. Biochem. 162:23-30, 1997.)。全RNA (20  $\mu$ g) を電気泳動し、Hybond-N+膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.) に移行させた。

dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  (図2BのSK063F08)、dermokine- $\beta$  (図2Bの $\beta$ -probe)、Kdap (XM149907) およびsuprabasin (318-765bp of BC051531) のcDNA断片はDIG RNA標識キット (Roche Applied Science) を用いて、DIG標識を施した。DIG標識RNAプローブとのハイブリダイゼーションは、製造者 (Roche Applied Science) により記載されたプロトコールに従って行った。種々の段階の胚発生におけるdermokine- $\alpha$  /  $\beta$  の発現を、Mouse Embryo Full Stage Blot (Seegene, Seoul, Korea) を用いて評価した。

#### 【0097】

[SEAP融合タンパク質のためのcDNAクローニングおよび構築]

第一鎖cDNAは、Superscript II逆転写酵素 (Invitrogen) を用いてヒト皮膚全RNA (Stratagene) から調製した。ヒトdermokine- $\alpha$  および- $\beta$  のORFをコードするDNA断片は、5' SalI-dermokine- $\alpha$  プライマー (配列番号: 17 / GTCGACGCCACCATGAACATGAAGCCGGCCACTGC) / 3' NotI-dermokine- $\alpha$  プライマー (配列番号: 18 / GCGGCCGCCCAAACTTCACCCACTGCAGCAGG) および5' SalI-dermokine- $\beta$  プライマー (配列番号: 19 / GTCGACGCCACCATGAAGTTCCAGGGGCCCTGG) / 3' NotI-dermokine- $\beta$  プライマー (配列番号: 20 / GCGGCCGCCCAAACTTCACCCACTGCAGCAGG) をそれぞれ用いるPCRによって増幅した。ヒトKdapおよびsuprabasin (0.7-kb断片; Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursor. J. Biol. Chem. 277:45195-45202, 2002.) のcDNAは、5' SalI-Kdapプライマー (配列番号: 21 / GTCGACGCCACCATGAAGATCCCGTCTTCCTGCC) / 3' NotI-Kdapプライマー (配列番号: 22 / GCGGCCGCCCTGGGCATCAGGAGTTGCGCTC) および5' SalI-suprabasinプライマー (配列番号: 23 / AATTGTCGACGCCACCATGCATCTTGCACGTCTGGTCGG) / 3' NotI-suprabasinプライマー (配列番号: 24 / ATATGCGGCCGCGCAGCTGGTTGGCCTCCTTGCTGG) をそれぞれ用いることによって増幅した。これらのプライマーは以下のGenBankアクセッション番号に基づいて設計した: AK003695 (dermokine- $\alpha$ )、BC035311 (dermokine- $\beta$ )、BX112106 (Kdap) およびBC063640 (suprabasin)。

#### 【0098】

これらのcDNAを、(His)<sub>6</sub>COOH末端タグでそれ自身のシグナルペプチドを欠いている分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) をコードしているcDNAの5'末端へ融合させた。pcDNA3.1-SEAP (His)<sub>6</sub>ベクターと命名したSEAP (His)<sub>6</sub>発現ベクターをpDREF-SEAP (His)<sub>6</sub>から構築した (Ikeda W, Kakunaga S, Itoh S, Shingai T, Takeuni K, Satoh K, Inoue Y, Hamaguchi A, Morimoto K, Takeuchi M, Imai T, Takai Y: J. Biol. Chem. 278:28167-28172, 2003)。SalIおよびNotIによる消化後に、dermokine- $\alpha$ 、dermokine- $\beta$ 、Kdap、およびsuprabasinのcDNAをpcDNA3.1-SEAP (His)<sub>6</sub>中のSalI-NotI部位にクローニングし、それぞれpcDNA3.1-dermokine- $\alpha$ -SEAP (His)<sub>6</sub>、pcDNA3.1-dermokine- $\beta$ -SEAP (His)<sub>6</sub>、pcDNA3.1-Kdap-SEAP (His)<sub>6</sub> およびpcDNA3.1-suprabasin-SEAP (His)<sub>6</sub>を得た。これ

ら発現ベクターをTransIT LT1 (Mirus, Madison, WI) を用いることにより、293/EBNA-1細胞に導入した。TALON Superflow Metal Affinity Resin(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)を使用したものを除いて、一時的に発現させ、培地中に分泌させたSEAP融合タンパク質を以前に記載した通りに精製した (Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizai M, Takagi S, Yoshie O: J. Biol. Chem. 272:15036-15042, 1997)。精製したSEAP融合タンパク質は、N末端アミノ酸シーケンシングに従属させた。

#### 【0099】

[ケラチノサイトのインビトロ分化]

集密に達していない正常ヒト表皮ケラチノサイトをHumedia KG2培地 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度0.15mM、ウシ下垂体抽出物 (BPE) を含む) 皿中 ( $2.5 \times 10^3$  個/ $\text{cm}^2$ ) の密度で播き、2日間培養した。続いて細胞をそれぞれBPEを含まない、正常 $\text{Ca}^{2+}$  培地 ( $\text{Ca}^{2+}$  0.15mM) あるいは高 $\text{Ca}^{2+}$  培地 ( $\text{Ca}^{2+}$  1.5mM) で何回か洗浄した。ケラチノサイトを次に正常 $\text{Ca}^{2+}$  培地中で2、4および6日間、あるいは高 $\text{Ca}^{2+}$  培地中で2日間培養した。qRT-PCRに用いるための全RNAを、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてこれらの細胞から調製した。また、トランスフェクションをする場合は、TransIT LT1 keratinocyte(Mirus)を用いて二日目の0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$  で培養したケラチノサイトにトランスフェクトした。

#### 【0100】

[定量的リアルタイムRT-PCR分析]

マウス組織の定量的リアルタイムPCR分析のために、種々のマウス組織 (8週齢雌Balb/cマウス) から、RNeasy Fibrous Tissue Miniキット (QIAGEN) を用いて全RNAを調製した。RNA PCRキット (AMV) Ver.2.1 (TAKARA, Shiga, Japan) をランダムな9量体プライマーとともに用いて、第一鎖cDNAテンプレートを総RNAから調製した。定量的リアルタイムPCRは、QuantiTect SYBR Green PCRキット (QIAGEN) およびABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster city, CA) で、SYBRGreen I色素の蛍光の増加を観測することによって二重化して行った。プライマーは、多数の転写物が同時に解析できるように単リアルタイムPCR熱プロフィール (95℃15分、および95℃15秒および60℃1分を40サイクル) に一致するようにデザインされた。全データは内部標準 (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ mRNA;  $\Delta\text{Ct}$  method, User Bulletin 2, Applied Biosystems) について標準化した。プライマーのセットは以下のとおりである。

#### 【0101】

マウスdermokine- $\alpha$  (AK003695)、順方向プライマー (5' -GACTGTACGAGAGCACAACCATG-3' / 配列番号: 25) および逆方向プライマー (5' -CTGAACCCCAGCTGTGGC-3' / 配列番号: 26);

マウスdermokine- $\beta$  (AK081753)、順方向プライマー (5' -CATGCCCCATCTCCCAGC-3' / 配列番号: 27) および逆方向プライマー (5' -CCCTCAATCTGTTTCCAGTTGAAG-3' / 配列番号: 28);

マウスKdap(XM149907)、順方向プライマー (5' -ACTGGCACGTCATCACTGATATGTTC-3' / 配列番号: 29) および逆方向プライマー (5' -GGAATCAGGAGCGGCACTTC-3' / 配列番号: 30);

マウスsuprabasin(AY115494)、順方向プライマー (5' -GTCAACAAGCCATTTATCAACTTCC-3' / 配列番号: 31) および逆方向プライマー (5' -GTGTGACAACCGGAGCATTC-3' / 配列番号: 32);

マウスGAPDH(NM008084)、順方向プライマー (5' -AAGGTGGTGAAGCAGGCATCTGAG-3' / 配列番号: 33) および逆方向プライマー (5' -GGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGAAGTC-3' / 配列番号: 34);

ヒトdermokine- $\alpha$  (AL832080)、順方向プライマー (5' -ATGAACATGAAGCCGGCCAC-3' / 配列番号: 35) および逆方向プライマー (5' -CGTTTCTGCAGTGATGACGCG-3' / 配列番号: 36);

ヒトdermokine- $\beta$  (BC035311)、順方向プライマー (5' -AAAGGCCATTGGCAAAGAGGCC-3' / 配列番号: 37) および逆方向プライマー (5' -ACCCTGTTGCCCAAAGCATCTG-3' / 配列番号: 38);



38);

ヒトKdap(BX112106)、順方向プライマー(5' -AACTGGCACGCCCTCTTTGAGTCTATC-3' /配列番号: 39)および逆方向プライマー(5' -ATGGTCACTGGGCATCAGGAGTTG-3' /配列番号: 40);

ヒトsuprabasin(BC063640)、順方向プライマー(5' -AACCAGCTGCTGAATGGCAACCA-3' /配列番号: 41)および逆方向プライマー(5' -ATGAAAGGCGTGTTGACCGAGG-3' /配列番号: 42);

ヒトケラチン10(J04029)、順方向プライマー(5' -CTTGGCAGAAACAGAAGGTCGCTAC-3' /配列番号: 43)および逆方向プライマー(5' -CGGTTTCAGCTCGAATCTCTTGC-3' /配列番号: 44);

ヒトインボルクリン(M13903)、順方向プライマー(5' -CCACCCAAACATAAATAACCACCCG-3' /配列番号: 45)および逆方向プライマー(5' -TAGCGGACCCGAAATAAGTGGAGC-3' /配列番号: 46);

ヒトTGase 1(NM000359)、順方向プライマー(5' -ATGTCTCAGGCCACGTCAAG-3' /配列番号: 47)および逆方向プライマー(5' -CTGCTCCCAGTAACGTGAGG-3' /配列番号: 48);

ヒト $\beta$ -actin(NM001101)、順方向プライマー(5' -ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAG-3' /配列番号: 49)および逆方向プライマー(5' -TGCTTGCTGATCCACATCTGC-3' /配列番号: 50);

およびヒトGAPDH(NM002046)、順方向プライマー(5' -ACTTCAACAGCGACACCCACTC-3' /配列番号: 51)および逆方向プライマー(5' -CCTGTTGCTGTAGCCAAATTCG-3' /配列番号: 52)。

#### 【0102】

[マウス表皮において発現した遺伝子のハイスループット in situハイブリダイゼーションスクリーニング]

マウス皮膚切片の in situハイブリダイゼーション用に cRNA プロブを生成するために、本発明者らは8週齢雌 Balb/c マウスの背中皮膚から cDNA ライブラリーを調製し、上記実験手順に述べたように均一化した。均一化は、低レベルで転写される遺伝子を効率よく拾い上げるためのこのタイプのスクリーニングは必須である。cDNA ライブラリーがうまく均等化されたかを確認するために、マウスのケラチン14(NM016958)、ケラチン5(NM027011)、インテグリン  $\alpha$ -M(NM008401)、およびロリクリン(NM008508) に対する遺伝子特異的プライマーで定量的リアルタイムPCRを、インテグリン  $\alpha$ -Mの発現レベルは比較的低いと思われるが、ケラチン14およびケラチン5は大量に発現されると思われる期待値で行った。cDNA 鋳型間の量を標準化するため、ロリクリン cDNA の量はマウスロリクリンに対する特異的プライマーで決定した。図1Aに示すように、ライブラリーの均等化後、ケラチン14およびケラチン5の両方ともおよそ1/5に減少していたことが示された。対照的に、インテグリン  $\alpha$ -M量は、およそ~42倍に増加していた。均等化効率についても、均等化の前後に、そのライブラリーから無作為に選択した~500のクローンのDNA配列決定により評価した。クラスター解析から、非均等化および均等化ライブラリーについての予備的な重複性が、それぞれ35.3%および1.3%であった。これらの知見は、均等化方法が、非常に豊富な cDNA 種の量、すなわちクローンの重複性 (redundancy) がうまく減少したことを示す。

#### 【0103】

マウスの足蹠表皮は、背中皮膚のような濾胞間の表皮よりも厚く、その形態はヒト表皮に似ている。従って本発明者らは、ハイスループット in situハイブリダイゼーション (HT-ISH) における遺伝子の層特異的発現を同定するために、マウス足蹠表皮(8週齢 Balb/c マウス)切片を使用した。切片を96-ウェルプラスチックプレートの各ウェル (100  $\mu$ l) 上に配置した後、均等化 cDNA ライブラリーから調製した DIG-標識した cRNA プロブを、ハイブリダイズした。切片9600個の中で、およそ~1000個でハイブリダイゼーションシグナルが認められた。

#### 【0104】

その後の配列決定によって、~600の重複した cDNA クローンが除かれ、独立した遺伝子



が残った。本発明者らはこれらの遺伝子に対するin situハイブリダイゼーションの再現性について評価し、核染色したクローンを除外した後、マウス足蹠表皮の特異的な層において発現した116種の独自のクローンを最終的に選択した。これらのクローンはもちろん以前に十分に特徴付けがなされた遺伝子を含んでいた。シクロフィリンA、Kdap、プロチモシン $\alpha$ 、ジアゼパム結合インヒビター、チューブリン $\beta$ -2鎖ホモログ、ラミンA、核分布Cホモログ、デスモプラキン、ケラチン関連タンパク質16-5、ヌクレオシド二リン酸キナーゼC、スモールプロリンリッチ様2、およびロリクリンに対するHT-ISHシグナルは、例として図1Bに示した。以前の報告と同じく、シクロフィリンA、Kdap、およびロリクリンの発現はそれぞれ、基底層/基底層上、基底層上および顆粒層に局限した (AL-Daraji WI, Grant KR, Ryan K, Sacton A, Reynolds NJ: Localization of calcinurin/ NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcinurin/ NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A. J. Invest. Dermatol. 118: 779-788, 2002.; Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium. Gene. 256:19-27, 2000.; Mehrel T, Hohl D, Rothnagel JA, Longley MA, Bundman D, Cheng C, Lichti U, Bisher ME, Steven AC, Steinert PM et al.: Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. Cell 61:1103-1112, 1990.)。これらの発見はHT-ISHスクリーニングが上手く行なわれたことを示すものである。

#### 【0105】

[有棘層において発現された新規遺伝子の同定]

本発明者らは、これらの116種のcDNAクローン中で、有棘層においてin situハイブリダイゼーションシグナルが特異的に検出された新規cDNA断片 (SK063F08) を同定した (図2A) 。その新規cDNAクローンの全長を得るために、マウスの公開された利用可能なESTデータベースを検索し、SK063F08の全配列を有するESTクローン (AK003695) を同定した (図2B) 。マウス皮膚におけるAK003695の発現は、RT-PCRにより確認した。このAK003695 ESTは、22bpの短い5'-非翻訳領域 (UTR)、アミノ酸104個のアミノ酸 (配列番号: 53) をコードしている315bpのオープンリーディングフレーム (ORF)、およびポリアデニル化シグナルを含む324bpの3'-UTRから構成されていた。

#### 【0106】

更に、データベースで別のより長いEST (AK081753) を発見した。これは3'末端 (98-657bp) でAK003695として同じ配列をシェアしていた。これは、これらのESTがスプライシングバリエーションであることを示している (図2B) 。マウス皮膚におけるAK081753の発現も、RT-PCRにより確認された。AK081753に対応するいくつかのクローニングされたcDNAのヌクレオチド配列のclose examinationにより、AK081753の743bpの部分に1個のヌクレオチド欠失、1132bpと1133bpの間に27bpの挿入、及び1197-1244bpの間の48bpの欠失が同定された。補正したAK081753 EST配列は、170bpの短い5'-UTR、517アミノ酸のタンパク質をコードする1554bpのORF、およびポリアデニル化シグナルを含む320bpの3'-UTRを有していた (図2B) 。

#### 【0107】

ヒトESTデータベースにおいて、マウスEST (AK003695およびAK081753) の各々に対して相同なふたつのEST (AL832080およびBC035311) を同定した (図2B) 。これらはヌクレオチド配列レベルでおよそ63%および55%同一であり、アミノ酸配列レベルではいずれも54%同一であった (図2B、C) 。開始コドン周辺のマウスおよびヒトESTであるAK003695、AK081753、AL832080およびBC035311に隣接する配列は、コザックにより提唱された翻訳開始部位と一致していた (Kozak, M: Nucleic Acids Res. 15:8125-8148, 1987.) 。

#### 【0108】

AK003695、AK081753、AL832080およびBC035311の推定アミノ酸配列は、GenBankのあらゆる他の配列との類似性を示さなかった。dermokine- $\beta$ において、2つの保存されたシステイン残基 (図2C中の矢印) および保存された潜在的なN-グリコシレーション部位 (図2C中の矢頭)、およびdermokine- $\alpha$  / - $\beta$  においていくつかの潜在的なN-ミリストイレー

ション部位があった。興味深いことに、SignalP serverは、これら全てのESTから推定されたアミノ酸配列から、それらのN-末端の典型的シグナル配列を推定した(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/#submission>)。更に2つのスプライシングバリエーション(splicing variant)によるC末側の共有部分は、非常に高いpI値を示し(pI=10.3; 図2 B、Cおよび図4 A参照)、これは骨形成タンパク質(BMP)、eotaxin、線維芽細胞増殖因子(FGF)、インターフェロン- $\beta$  (IFN- $\beta$ )、インターロイキン(IL)、血小板由来成長因子(PDGF)、Wntなどの様々なサイトカイン類において共通していた。従って以下に説明するように、これらのペプチドのmRNAは皮膚において大量に発現されていることを考慮して、本発明者らは暫定的に、短いおよび長いスプライシングバリエーションを、それぞれ「dermokine  $\alpha$  および  $\beta$ 」と命名した(図2 C)。

#### 【0109】

##### [dermokine - $\alpha$ / $\beta$ 遺伝子の構成]

Ensembl Human Genome Browserは、染色体19q13.1上にヒトdermokine -  $\alpha$  および  $\beta$  に対する遺伝子を位置づけ(ENSG00000161249)、それは~14-kbの範囲に広がっている。図3 Aに示すように、ヒトdermokine- $\alpha$  および  $\beta$  は、それぞれ6個および16個のエキソンからなる。興味深いことに、dermokine- $\alpha$  遺伝子のエキソン1は、推定翻訳開始部位およびシグナル配列の両方を有し、dermokine- $\beta$  遺伝子のエキソン11および12の間に存在し、それらは別のプロモーターによって転写されることを示唆している。推定終止コドンはdermokine- $\alpha$  のエキソン5、すなわちdermokine- $\beta$  のエキソン15内に含まれた。マウスのdermokine- $\alpha$  /- $\beta$  遺伝子は、Ensembl Mouse Genome BrowserにおいてENSMUSG00000036665として、ヒトにおける19q13.1とシンテニーを共有した領域である染色体7上にマッピングされた。マウスdermokine- $\beta$  遺伝子の正確なゲノム構成は、入手可能なゲノムデータベース由来の情報が不完全であるために、決定されていないが、同じゲノム構成がマウスdermokine- $\alpha$  遺伝子座の周辺に確認された。

#### 【0110】

ヒト染色体19q13.1とマウス7番染色体において、dermokine遺伝子の両側にケラチノサイト-関連ペプチドであるsuprabasinおよびケラチノサイト分化-関連タンパク質(Kdap)についてふたつの遺伝子が、マッピングされており(図3 B): 最近、両タンパク質は重層上皮において高度に発現されることが報告された(Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium. *Gene*. 256:19-27, 2000.; Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursor. *J. Biol. Chem.* 277:45195-45202, 2002.)。興味深いことに、suprabasin、dermokine- $\alpha$  /- $\beta$  およびKdap遺伝子は、転写と同じ方向にこの順番で並んでいる。ケラチノサイト特異的タンパク質をコードしていない精巣特異的なグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼおよびユビキタスに発現するGPR43に対する遺伝子は、各々、suprabasinの上流およびKdapの下流に位置しているが(Welch JE, Schatte EC, O'Brien DA, Eddy EM: Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells. *Biol. Reprod.* 46:869-878, 1992.; Sawazdargoら、1997)、しかしこれらの遺伝子は、suprabasin、dermokine- $\alpha$  /- $\beta$  およびKdapとは反対方向に転写される。これらの知見、すなわちケラチノサイト-関連遺伝子の新規クラスターが存在するということは、suprabasin、dermokine- $\alpha$  /- $\beta$  およびKdap mRNAの転写が、同調された方法で調節されることを示唆している。

#### 【0111】

##### [dermokine- $\alpha$ /- $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinの分泌]

図4 Aに示したように、SignalP serverは、dermokine- $\alpha$  /- $\beta$  のみではなく、Kdapおよびsuprabasinも、それらのN-末端に推定シグナル配列を有すると推定した(図4 A)。これは、以前にKdapにおいて指摘されており((Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium. *Gene*. 256:19-27, 2000.))、一方suprabasinのN



-末端疎水性配列は、潜在的な膜貫通ドメインとして考えられている(Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursor. J. Biol. Chem. 277:45195-45202, 2002.)。しかし、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin遺伝子は、遺伝子複合体を形成するので、それらの産物の全てがケラチノサイトから分泌されると推測したくなる。この考えを試験するために、ヒトdermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin (0.7-kb転写産物)cDNAを、哺乳類の発現ベクターpcDNA3.1-SEAP(His)<sub>6</sub>に挿入し、それらのC-末端をSEAP(His)<sub>6</sub>でタグ付けした融合タンパク質を発現させた。これらの融合タンパク質は、培養した293/EBNA-1細胞において一過性に発現し、培養培地において、抗-His抗体を使用するイムノブロッティングにより検出された(図4B)。興味深い点は、SDS-PAGEゲルにおいて、培地において検出された細胞は、融合タンパク質の推定分子質量と比べ、上側に有意にシフトしていたことであり、このことは、分泌されたタンパク質が、グリコシル化および/または分子間ジスルフィド結合によって、もしかすると翻訳後修飾されたことを示唆している。

#### 【0112】

次に、N-末端推定シグナル配列が、これらの分泌された融合タンパク質において取り除かれているかどうかを調べた。分泌された融合タンパク質は各々、TALON Superflow Metal Affinity Resinにより培養培地から単一のバンドとして精製された(図4C)：本試験に用いたトランスフェクション条件および培養条件では、dermokine- $\alpha$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、Kdap-SEAP(His)<sub>6</sub>、およびsuprabasin-SEAP(His)<sub>6</sub>は各々、収量0.15mg/L、0.3mg/L、13.5mg/L、および15mg/Lで精製された。これらの精製タンパク質のN-末端を直接アミノ酸配列決定したところ、これらの分泌タンパク質は、正確には図4Aにおいて予測されたような推定N-末端シグナル配列を欠いていることが明らかになった(図4C)。これらの知見は、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinは、それらのN-末端において切断され、更に翻訳後修飾を受け、その結果分泌されたことを示している。

#### 【0113】

[組織におけるdermokine  $\alpha$  および  $\beta$ 、Kdapならびにsuprabasinの発現パターン]

様々なマウス組織におけるdermokine- $\alpha$  /  $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin転写産物の発現を、ノーザンブロットにより試験した(図5A)。dermokine- $\alpha$  および  $\beta$  の両方にハイブリダイズするSK063F08プローブ(図2B参照)は、皮膚においては強く、胃においては弱いふたつのバンド0.6kbおよび2.0kbを検出した(Dermokine- $\alpha$  /  $\beta$ 、図5A)；長期間曝露した場合、これらのバンドは、肺においても検出された(データは示さず)。それらの大きさから判断して、これらのバンドは、それぞれdermokine- $\alpha$  と  $\beta$  に対応していると考えられる。実際、dermokine- $\beta$ -特異的プローブ( $\beta$ -プローブ、図2B)を使用したところ、2.0-kbバンドのみを検出した(Dermokine- $\beta$ 、図5A)。Kdapは、胃および皮膚において大量に発現され、肺において少量発現された(Kdap、図5A)。suprabasin遺伝子の0.7-kbおよび2.2-kbスプライシングバリエーションの発現パターンは、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  のそれと非常に類似していた(Suprabasin 図5A)。更に、本発明者らは、定量的RT-PCR(qRT-PCR)により、これらのタンパク質の発現を調べた(表1)。

#### 【0114】

表1は、様々な上皮組織におけるdermokine- $\alpha$ 、 $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinの発現を定量的リアルタイムRT-PCRで解析した結果を示す。総RNAは8週齢雌Balb/cマウスからの様々な上皮組織から調整し、マウスdermokine- $\alpha$ 、 $\beta$ 、Kdap、およびsuprabasinに特異的なプライマーを用いてSYBR Greenベース定量的リアルタイムRT-PCRを行なった。全データは内部GAPDH mRNA対照について標準化した。GAPDH ( $\times 10^{-3}$ )に対する比：- = 0~0.1；+ = 0.1~1；++ = 1~10；+++ = 10~100；++++ = 100~1000；+++++ = 1000~2000；++++++ = 2000~3000。

#### 【0115】

【表 1】

組織	Dermokine- $\alpha$	Dermokine- $\beta$	Kdap	Suprabasin
背中皮膚	+++	++++	+++	+++
足蹠皮膚	++++	+++++	++++	++++
舌	+++	++++	+++	+++
食道	+++	++++	++++	+++
前胃部	++++	+++++	+++++	++++
腺胃	++	++	++	+
膈	+++	+++	+++	++
気管	++++	+++	++	++
肺	+++	+++	-	++
膀胱	+	+	+	+
胸腺	++	++	+	+
小腸	-	-	-	-
肝臓	-	-	-	-

## 【0 1 1 6】

これはノーザンブロットの結果と非常に良く一致し、dermokine- $\alpha/\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinは、皮膚、舌、食道、前胃部、および膈などの重層上皮において大量に発現していた。これらは、気管および膀胱、更には胸腺において発現され、このことは、Kdapが気管および膀胱で発現され、suprabasinは胸腺で発現されたという報告(Oomizu, S., Sahuc, F., Asahina, K., Inamatsu, M., Matsuzaki, T., Sasaki, M., Obara, M., Yoshizato, K. (2000) Gene 256, 19-27, Park GT, Lim SE, Jang S, Morasso MI: J. Biol. Chem. 277:45195-45202, 2002)と一致している。例えばRT-PCRであっても、肝臓や小腸のような典型的単層上皮においては、これらは検出不可能であった。従って、dermokine- $\alpha/\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinは、若干の例外はあるものの重層上皮特異的に分泌されるタンパク質であると本発明者らは結論付けた。この結論は、染色体上で複合体を形成しているこれらの遺伝子の発現は、重層上皮に特異的方式で調和を持って調節されているという注目点に一致している。従って本発明者らはここで、この遺伝子複合体は、SSC(重層上皮分泌ペプチド複合体(stratified epithelium secreted peptides complex))と称することを提唱する。

## 【0 1 1 7】

次に本発明者らは、重層上皮内で、SSC産物の発現を、詳細に比較し、マウス足蹠表皮の連続切片について、in situ ハイブリダイゼーション解析を行った。8個の表皮の連続切片を、dermokine- $\alpha/\beta$ 、KdapおよびsuprabasinについてのアンチセンスまたはセンスcRNAプローブとハイブリダイズした。図5Bに示したように、dermokine- $\alpha/\beta$  (SK063F08、図2B)、dermokine- $\beta$  プローブ( $\beta$  probe、図2B)およびsuprabasinのアンチセンスプローブは、表皮有棘層を通じて均等に、ハイブリダイゼーションシグナルを生じた。対照的に、Kdap-特異的プローブは、先にOomizuらが報告したように、専ら有棘層の基底上部にハイブリダイズした(Oomizu S, Sahuc F, Asahina K, Inamatsu M, Matsuzaki T, Sasaki M, Obara M, Yoshizato K: Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium. Gene. 256:19-27, 2000.)。これらの結果は、SSC産物の発現は、表皮内におけるケラチノサイト(keratinocyte)が重層化分化を開始する際に活性化されたことを示唆している。

## 【0 1 1 8】

[SSC 産物およびケラチノサイト分化]

胚の発生時におけるdermokine- $\alpha/\beta$ の発現を、SK063F08プローブを使用し、ノーザン



プロットにより試験した。図 6 A に示したように、dermokine- $\beta$  は、E15.5 で発現され始め、この時期は、表皮層化とほぼ同時である。dermokine- $\alpha$  は、E16.5 で検出可能であり、E17.5 まで増加し、E18.5 までに減少する。これらの知見は、dermokine- $\alpha$  / - $\beta$  は、マウス発生初期において、in vivo における表皮の重層化に関連していることを示唆している。

#### 【0119】

最後に、SSC 産物とケラチノサイト分化の間の関係を更に試験するために、初代培養ヒトケラチノサイトの in vitro 分化の期間の SSC 産物発現レベルの変化を、qRT-PCR により追跡した。この分化は、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇 (0.15mM から 1.50mM) によるか、または 0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$  での細胞密度の上昇 (2日間培養から6日間培養) により、誘導された。ヒトケラチノサイトにおいて、後者の方法は、終末分化の誘導に関してより有効であることが報告されており (Poumay Y, Pittelkow MR: Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. J. Invest. Dermatol. 104:271-276, 1995.)、このことは、qRT-PCR により、ケラチン10、TGase 1、およびインボルクリンの mRNA レベルを測定することにより確認された (図 6 B)。興味深いことに、SSC 産物の発現は全て、終末分化が in vitro において進行している限りは、明確に誘導された。

#### 【0120】

[Dermokine- $\alpha$  がケラチノサイトの分化に及ぼす影響]

次にケラチノサイトの分化に Dermokine- $\alpha$  が及ぼす影響を調べた。12 well dish 中に 0.15mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で、2500 cells/cm<sup>2</sup> で培養したケラチノサイトに対して、ヒト Dermokine- $\alpha$  の C 末端側に HA-tag をつけた cDNA を一過性に transfection により発現させた。その結果、6 日後に total RNA を回収すると、Dermokine- $\alpha$  を発現させたケラチノサイトは Mock に比べて、有意に total RNA の回収量が低かった (図 7 A)。この事は、増殖が抑制されていることを示唆している。

また、重層上皮の分化マーカーである、インボルクリンに対するプライマーでそのような RNA から qRT-PCR 法によりその発現量を GAPDH を標準として定量したところ、Mock に比べて、有意に上昇していた (図 7 B)。この事は Dermokine- $\alpha$  の発現によりケラチノサイトの分化が促進された事を示唆した。以上の事から、Dermokine- $\alpha$  はケラチノサイトの増殖、分化の遂行に重要な役割を果たす事が示唆された。

#### 【0121】

[SSC タンパク質群に対する抗体の作成]

ヒト dermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdap、Suprabasin に対するウサギポリクローナル抗体を作成する為に図 4 で用いた、pcDNA3.1-SEAP(His)6 vector にヒト dermokine- $\alpha$ 、Kdap、Suprabasin を導入したもの、及び、Dermokine- $\beta$  から、dermokine- $\alpha$  との共通部分を欠失したものの (dermokine- $\beta$ - $\Delta$ C) を作成し (図 8 A)、293/EBNA-1 において一過性に発現させた。得られた培養培地から TALON Superflow Metal Affinity Resin により、単一のバンドとして精製した (図 8 B)。これらの融合タンパク質をウサギに免疫し、抗血清を得た。得られた抗血清を用いて、同じく 293/EBNA-1 に一過性にヒト dermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\beta$ - $\Delta$ C、Kdap、Suprabasin を発現させた培養上清に対して immunoblot を行った。その結果、抗血清はこれらの四種類のタンパク質に対して反応する事が明らかとなった (図 8 C)。

【図面の簡単な説明】

#### 【0122】

【図 1】ハイスループット in situ ハイブリダイゼーション (HT-ISH) の結果を示す写真である。A, 均等化したマウス背中皮膚 cDNA ライブラリーの評価した結果を示す。開始ライブラリー (E0) および均等化ライブラリー (E1 および E2) は重複して定量的リアルタイム PCR 解析によって分析した。全データは内部標準であるロリクリンについて標準化した。E0 と比較して、E2 では、ケラチン 14 およびケラチン 5 の両方の cDNA (豊富な cDNA) がそれぞれ約 1/5 量にまで減少した。しかしインテグリン  $\alpha$ -M (希少な cDNA) は約 42 倍量に増加した。B, HT-ISH シグナルの例を示す写真である。均等化した cDNA ライブラリー (E2) より調製した cRNA プローブが、96 ウェルフォーマットに

おける成体マウス足蹠表皮の切片にハイブリダイズした。シクロフィリンA (NM008907) は基底層および基底層上に特異的に発現した (a)。Kdapは基底上細胞層において検出された (b)。プロチモシン  $\alpha$  (NM008972) (c)、ジアゼパム結合インヒビター (BC028874) (d)、チューブリン  $\beta$ -2鎖類似遺伝子 (XM130158) (e)、ラミンA (BC015302) (f)、核分布Cホモログ (NM010948) (g)、デスモプラキンI (XM138593) (h)、ケラチン関連タンパク質16-5 (NM130857) (i)、およびヌクレオシド二リン酸キナーゼC (AF288691) (j) は有棘層および顆粒層で検出された (k)。ロリクリン (U09189) mRNAはもっぱら顆粒層においてのみ検出された (l)。特異的なシグナルは、各クローンに対するセンスプローブで検出されなかった (データ示さず)。ダッシュ線は、表皮および真皮の間の境界を表わしている。スケールバー; 50  $\mu$ m。

【図2】 dermokine- $\alpha$  および  $\beta$  の同定を示す図および写真である。A, 成体マウス足蹠表皮の切片についてSK063F08プローブでのHT-ISHシグナルを示す。アンチセンスSK063F08プローブ (Antisense) は、表皮の有棘層から強烈なシグナルを与えたが、センスプローブ (Sense) ではシグナルは検出されなかった。H+Eはヘマトキシリン-エオジン染色画像である。ダッシュ線は、表皮および真皮の間の境界を表わしている。スケールバー; 50  $\mu$ m。B, SK063F08配列を有するマウスESTおよびそれらのヒトホモログESTを示す図である。SK063F08の全長配列を有するマウスEST、および3'-末端領域でAK003695と同じ配列をシェアした (AK003695では98-661 bpおよびAK081753では1505-2064 bp) マウスEST (AK081753) は、これらのESTがスプライシングバリエーションであることを示唆している。AK003695およびAK081753のヒトホモログは、それぞれ2つのEST、AL832080およびBC035311として発見された。ORFは四角で囲んで示した。 $\beta$  プローブはノーザンブロットイングおよびin situハイブリダイゼーションに使用した (図5および6参照)。1個のヌクレオチドの挿入 (グアニン) がAK081753配列の743位において発見された。また、1132bpと1133bpの間に27bpの挿入、1197~1244bpの欠失が確認された。C, AK003695/AL832080およびAK081753/BC035311の各ESTから推測されるマウスおよびヒトdermokine- $\alpha$  および  $\beta$  のアミノ酸配列を示す。SignalP serverにより予想された推定シグナル配列に下線を付け、dermokine- $\alpha$  と  $\beta$  の間の同一領域は、四角で囲んだ。dermokine- $\beta$  のグリシンおよびセリン-リッチドメインは、ダッシュ線で示した。dermokine- $\alpha$  およびdermokine- $\beta$  の配列データは、GenBankに、各々、マウスにおいてはアクセッション番号AK003695およびAK081753にて、ヒトにおいてはアクセッション番号AL832080およびBC035311にて登録されている。

【図3】 dermokine- $\alpha$  および  $\beta$  遺伝子の構造を示す図である。A, 染色体19q131上のヒトdermokine- $\alpha$  および  $\beta$  遺伝子のエキソンを示す。白ボックスおよび黒ボックスは、それぞれmRNAのコード領域および非コード領域をコードしているエキソンを表わしている。推定翻訳開始および終止部位はそれぞれATGおよびTGAで示した。dermokine- $\alpha$  のエキソン2-6は、エキソン12-16としてdermokine- $\beta$  によって利用され、COOH-末端配列および3'-非コード領域と同一であった。B, suprabasin、dermokine- $\alpha$  /  $\beta$  およびケラチノサイト分化関連タンパク質 (Kdap) に対する遺伝子を有する、マウスおよびヒト遺伝子座を示す。矢印は、転写方向を示している。精巢特異的GAPDH、精巢特異的グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子; GPR43、Gタンパク質共役型受容体43遺伝子。

【図4】 dermokine- $\alpha$  /  $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinの分泌を解析した結果を示す図および写真である。A, ヒトdermokine- $\alpha$  /  $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin (0.7-kb転写産物) のN末端での推定シグナルペプチドの概略図を示す。矢頭は、予測された切断部位を表す。pI値は含有されたアミノ酸残基から計算した。dermokine- $\alpha$  および対応するdermokine- $\beta$  のC末端領域の推定分泌フォームが、かなり高いpI値 (pI=10.3) を示したことは特筆すべきである。B, 293/EBNA-1細胞における、4種のSEAP(His)<sub>6</sub>融合タンパク質である、dermokine- $\alpha$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、Kdap-SEAP(His)<sub>6</sub>、およびsuprabasin-SEAP(His)<sub>6</sub>を表す写真である。dermokine- $\alpha$ 、 $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasinは、(His)<sub>6</sub> C-末端タグとともにそれ自身のシグナルペプチドを欠い



ている分泌アルカリ性ホスファターゼ (SEAP) のN末端へ融合した。dermokine- $\alpha$ 、 $\beta$ 、Kdapおよびsuprabasin (またコントロールとしてSEAP(His)<sub>6</sub>) の推定シグナル配列を運ぶこれらの融合タンパク質を、293/EBNA-1細胞において一過性に発現させた。培養培地 (各レーンに10  $\mu$ g) (Medium) は、SDS-PAGEにより分離し、かつ抗-His抗体によりイムノブロッティングを施した。培地に分泌された融合タンパク質は、矢頭で示した。4種の融合タンパク質の全ては、培地中に分泌された。分泌されたKdap-SEAP(His)<sub>6</sub>が高い分子量 (アスタリスク) のバンドで検出された。C, 培養培地から精製したdermokine- $\alpha$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、Kdap-SEAP(His)<sub>6</sub>、およびsuprabasin-SEAP(His)<sub>6</sub>の写真である。分泌融合タンパク質を含む293/EBNA-1細胞の培養培地を回収し、融合タンパク質をTALON金属アフィニティーレジンによって精製した。精製したタンパク質 (矢印) をSDS-PAGEにより分解し、引き続きクーマシーブリリアントブルー染色し、N末端アミノ酸配列を解析した。分泌されたdermokine- $\alpha$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、dermokine- $\beta$ -SEAP(His)<sub>6</sub>、Kdap-SEAP(His)<sub>6</sub>、およびsuprabasin-SEAP(His)<sub>6</sub>のN末端アミノ酸配列は、Aにおいて予測されたように、それぞれWGADA、GPLQS、ATLGG、およびASDDPとして検出された。

【図5】組織におけるdermokine- $\alpha$ /- $\beta$ 、Kdap、およびsuprabasinの発現パターンを示す写真である。A. ノーザンブロッティングの結果を示す写真である。マウス組織からの総RNA (20  $\mu$ g) をブロットしたナイロン膜を、各遺伝子に特異的なDIG-標識したcRNA断片でプロービングした。dermokine- $\alpha$  (矢頭) および対応するdermokine- $\beta$  (矢印) のC末端領域の両方にハイブリダイズするSK063F08プローブは2つのバンド (Dermokine- $\alpha$ /- $\beta$ ) を形成したが、dermokine- $\beta$ の特異的にハイブリダイズする $\beta$ プローブは1つのバンド (Dermokine- $\beta$ ) だけ形成した (図2B参照)。メンブレンは、Kdap特異的プローブ (Kdap)、suprabasin特異的プローブ (Suprabasin) およびコントロールGAPDH特異的プローブとハイブリダイズした。全ての遺伝子は皮膚に多く発現し、少ないながらも胃でも発現していた。Kdapはまた肺でも検出された。B, 表皮でのdermokine- $\alpha$ 、 $\beta$ 、Kdap、およびsuprabasinの発現パターンを示す写真である。マウス足蹠表皮の連続切片は、dermokine- $\beta$  (SK063F08; Dermokine- $\alpha$ /- $\beta$ )、dermokine- $\beta$  ( $\beta$ プローブ; Dermokine- $\beta$ )、Kdap (Kdap) およびsuprabasinのdermokine- $\alpha$ /C末端領域に対して特異的なアンチセンス (Antisense) およびセンス (Sense) プローブとハイブリダイズした。センスプローブとハイブリダイズした切片のヘマトキシリン-エオジン染色を示した (H+E)。dermokine- $\alpha$ /- $\beta$ 、dermokine- $\beta$  およびsuprabasin特異的ハイブリダイゼーションシグナルが、等しくマウス足蹠表皮の有棘層において検出された。しかし、Kdap特異的シグナルは有棘層の基底上領域に局限していた。センスプローブとハイブリダイズする切片に特異的なシグナルは検出されなかった。ダッシュ線は表皮および真皮の間の境界を示す。スケールバー; 50  $\mu$ m。

【図6】SSC産物およびケラチノサイト分化を示す写真および図である。A、マウス胚発生の中のdermokine- $\alpha$ /- $\beta$ の発現。マウス胚の全ステージのブロット (Seegene) はDIG-標識されたSK063F08のcRNA断片でプローブした。dermokine- $\beta$  (矢印) はE15.5で発現を始めた。Dermokine- $\alpha$  (矢頭) はまずE16で現れ、E17.5までその発現が増加し、その後E18.5までに減少した。下段パネルはエチジウムブロマイド染色メンブレンである。B、初代培養ヒトケラチノサイトのin vitro分化を示す図である。ヒト初代ケラチノサイトは、異なるCa<sup>2+</sup>濃度下 (0.15mM Ca<sup>2+</sup> および1.50mM Ca<sup>2+</sup>) 2日間 (2 days) で培養した、並びに0.15mM Ca<sup>2+</sup>濃度 (0.15mM Ca<sup>2+</sup>) 下異なる細胞密度 (2 days、4 days、および6 days) で培養した。分化はCa<sup>2+</sup>濃度の増加 (0.15mMから1.50mM) あるいは0.15mM Ca<sup>2+</sup>濃度での細胞密度の減少 (2-dayから6-day) によって誘導された。総RNAはこれらの細胞から調製し、かつSYBR Green-ベースのqRT-PCR解析を、dermokine- $\alpha$ 、 $\beta$ 、Kdap、suprabasinおよび分化特異的遺伝子 (ケラチン10、インボルクリン、ロリクリンおよびトランスグルタミナーゼ1) について特異的プライマーおよびコントロール $\beta$ アクチン遺伝子で行った。全データは内部GAPDH mRNAコントロール



について標準化した。分化特異的遺伝子に同じく、dermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、Kdap、およびsuprabasin遺伝子は分化が誘導されると有意に上方調節された。コントロール $\beta$ アクチン遺伝子の転写は誘導されなかった。バーは、2連して行われた3回の個別の実験の標準偏差を表わしている。

【図7】 Dermokine- $\alpha$  がケラチノサイトの分化に及ぼす影響について示す図である。A、12 wellからのtotal RNAの収量について示すグラフである。12 wellに2500 cells/cm<sup>2</sup>で培養したケラチノサイトに対して、TransIT LT1 kartinocyteを用いてpcDNA-human Dermokine- $\alpha$ -HAを発現させた。MockとしてはpcDNA3.1のみを用いた。Total RNAを抽出したところ、human Dermokine- $\alpha$ -HAを発現させたケラチノサイトでは有意にtotal RNAの回収量が減少した。B、インボルクリン (Involucrin) の発現について示すグラフである。Aで調製した、total RNAから、qRT-PCRをインボルクリンのmRNAに対して行った。Dermokine- $\alpha$ を発現させると、有意にインボルクリンのmRNAが増加した。

【図8】 図8は、SSCタンパク質群に対する抗体を作成したことを示す図である。A、抗原を作成するために用いられたConstructの図である。dermokine- $\beta$ - $\Delta$ Cはdermokine- $\beta$ におけるdermokine- $\alpha$ との共通部分を欠失したものでdermokine- $\beta$ に特異的な抗体を作成するために用いられた。B、抗原に用いたタンパク質を示す図である。抗原には、293/EBNA-1細胞へ一過性に発現させた、dermokine- $\alpha$ 、dermokine- $\beta$ - $\Delta$ C、Kdap、SuprabasinのSEAP(His)6との融合タンパク質をそれぞれ用いた。図はCBB染色像である。C、SSCタンパク質群に対する抗血清を用いたimmunoblotを示す写真である。293/EBNA-1細胞にdermokine- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\beta$ - $\Delta$ C、Kdap、Suprabasinをそれぞれ一過性に発現させて、培養上清を調製した。それらを電気泳動後、ニトロセルロース膜へトランスファーし、各タンパク質に対する抗血清でimmunoblotした。培養上清のCBB染色像も併に示した。dermokine- $\alpha$ に対する抗体は、dermokine- $\beta$ - $\Delta$ Cには反応していない。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Eisai Co.,Ltd.

&lt;120&gt; Novel stratified epithelium-secreting protein gene complex, and use there of

&lt;130&gt; E1-A0208

&lt;160&gt; 53

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 661

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (23)..(337)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

ctgactgtac gagagcacaa cc atg aaa cca gtc acg gcc tct gct ctg ctg 52  
 Met Lys Pro Val Thr Ala Ser Ala Leu Leu  
 1 5 10

ctt atc ctg ctg ggt gtg gcc tgg cgt gga gac agc cac agc tgg ggt 100  
 Leu Ile Leu Leu Gly Val Ala Trp Arg Gly Asp Ser His Ser Trp Gly  
 15 20 25

tca gat ctg tca tct ctg cag aag agg gca ggt gga gct gac cag ttt 148  
 Ser Asp Leu Ser Ser Leu Gln Lys Arg Ala Gly Gly Ala Asp Gln Phe  
 30 35 40

tct aag cct gaa gca aga caa gat ctt tca gct gac tca tcc aag aac 196  
 Ser Lys Pro Glu Ala Arg Gln Asp Leu Ser Ala Asp Ser Ser Lys Asn  
 45 50 55

tac tac aat aac cag cag gtg aat cct act tac aac tgg caa tac tat 244  
 Tyr Tyr Asn Asn Gln Gln Val Asn Pro Thr Tyr Asn Trp Gln Tyr Tyr  
 60 65 70

acc aag acc act gcc aag gcg gga gtc aca cct tca tct tcc tcg gct 292  
 Thr Lys Thr Thr Ala Lys Ala Gly Val Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ala  
 75 80 85 90

tcc cgg gca caa cct ggc ctg ctg aag tgg ctg aag ttt tgg tag 337

Ser Arg Ala Gln Pro Gly Leu Leu Lys Trp Leu Lys Phe Trp  
 95 100

aacattcctt ctagtcactg cggactcctc acgaatgcac acaggtcttc agggagtttg 397  
 actgtcctta cccagagtcc tctctgatgc agctgaccta cctgggcatg acaagcctgt 457  
 catctcgcct ggggacctgg tttatctgtc ctcattctcc ccattcgatt gtggtgtctt 517  
 ggcgactaat cagtttcatt gtataaccag ccagatcttc acctcttctt ccgtacgtga 577  
 ccgcaagtcc ctggaacgag gcatctggag cttcctactc tccagtttct ctgtggaaat 637  
 aaaacatgac tctttgtttc cctg 661

<210> 2  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 2  
 Met Lys Pro Val Thr Ala Ser Ala Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Val  
 1 5 10 15  
 Ala Trp Arg Gly Asp Ser His Ser Trp Gly Ser Asp Leu Ser Ser Leu  
 20 25 30  
 Gln Lys Arg Ala Gly Gly Ala Asp Gln Phe Ser Lys Pro Glu Ala Arg  
 35 40 45  
 Gln Asp Leu Ser Ala Asp Ser Ser Lys Asn Tyr Tyr Asn Asn Gln Gln  
 50 55 60  
 Val Asn Pro Thr Tyr Asn Trp Gln Tyr Tyr Thr Lys Thr Thr Ala Lys  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Val Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ala Ser Arg Ala Gln Pro Gly  
 85 90 95  
 Leu Leu Lys Trp Leu Lys Phe Trp  
 100

<210> 3  
 <211> 2043  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>



<221> CDS  
 <222> (170)..(1723)  
 <223>

<400> 3  
 gctggaaagc agggaagtct gggaacagag agagaaggct gtgggtcctg gggaaggaga 60  
 ataaggaagc aaggaaggaa aggaaaaggt ctcagcccag aggaagaaag aagggaacaa 120  
 atagactggg ctgcagacat cctcagagga gagagggagc tgggcagag atg aag cta 178  
 Met Lys Leu  
 1  
 cag ggc tct ctg gcc tgc ctc ctg ctg gcc cta tgt ctg ggt ggt ggg 226  
 Gln Gly Ser Leu Ala Cys Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu Gly Gly Gly  
 5 10 15  
 gca gct aac ccg ctg cac agt gga ggg gag ggc aca ggg gca agt gct 274  
 Ala Ala Asn Pro Leu His Ser Gly Gly Glu Gly Thr Gly Ala Ser Ala  
 20 25 30 35  
 gcc cat gga gca gga gat gcc att agc cat gga att gga gag gct gtg 322  
 Ala His Gly Ala Gly Asp Ala Ile Ser His Gly Ile Gly Glu Ala Val  
 40 45 50  
 ggc caa ggg gct aaa gaa gca gcc agc tct gga atc cag aat gcc cta 370  
 Gly Gln Gly Ala Lys Glu Ala Ala Ser Ser Gly Ile Gln Asn Ala Leu  
 55 60 65  
 ggc cag ggg cac gga gag gaa ggt ggc tcc aca ttg atg ggg agc aga 418  
 Gly Gln Gly His Gly Glu Glu Gly Gly Ser Thr Leu Met Gly Ser Arg  
 70 75 80  
 ggc gat gtt ttt gag cac cgg ctt ggg gaa gca gca aga tct ctg ggg 466  
 Gly Asp Val Phe Glu His Arg Leu Gly Glu Ala Ala Arg Ser Leu Gly  
 85 90 95  
 aac gct ggg aat gag att ggc aga cag gct gag gat atc att cgc caa 514  
 Asn Ala Gly Asn Glu Ile Gly Arg Gln Ala Glu Asp Ile Ile Arg Gln  
 100 105 110 115  
 ggg gta gat gct gtc cac aac gct ggg tcc tgg ggg aca tct gga ggt 562  
 Gly Val Asp Ala Val His Asn Ala Gly Ser Trp Gly Thr Ser Gly Gly  
 120 125 130  
 cat ggc gca tat ggc tct caa ggt ggt gct gga gtc cag ggc aat cct 610  
 His Gly Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Gly Ala Gly Val Gln Gly Asn Pro  
 135 140 145  
 ggt cct caa ggg aca ccc tgg gcc tca gga ggc aac tat ggg act aac 658

Gly Pro Gln Gly Thr Pro Trp Ala Ser Gly Gly Asn Tyr Gly Thr Asn	
150 155 160	
tct ctg ggt ggc tct gtg ggt cag ggt ggc aat ggc gga cca ctc aac	706
Ser Leu Gly Gly Ser Val Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Pro Leu Asn	
165 170 175	
tat gaa acc aat gcc cag gga gct gtg gct cag cct ggc tac ggg aca	754
Tyr Glu Thr Asn Ala Gln Gly Ala Val Ala Gln Pro Gly Tyr Gly Thr	
180 185 190 195	
gtg aga ggc aac aac cag aac tca ggg tgt acc aac ccc cca cct tct	802
Val Arg Gly Asn Asn Gln Asn Ser Gly Cys Thr Asn Pro Pro Pro Ser	
200 205 210	
ggc tcc cat gaa agc ttc agt aac tct ggg gga agc agc aat gat ggc	850
Gly Ser His Glu Ser Phe Ser Asn Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Gly	
215 220 225	
agt cgt ggt agc caa ggc agt cat ggc agt aat ggt cag ggc agc agc	898
Ser Arg Gly Ser Gln Gly Ser His Gly Ser Asn Gly Gln Gly Ser Ser	
230 235 240	
ggt aga ggc ggt ggc caa ggc aac agc gac aac aat ggc agc agt agc	946
Gly Arg Gly Gly Gly Gln Gly Asn Ser Asp Asn Asn Gly Ser Ser Ser	
245 250 255	
agt agc agc ggc agc aac agt ggc aac agc aac agt ggc aac agc ggc	994
Ser Ser Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Ser Asn Ser Gly Asn Ser Gly	
260 265 270 275	
aac agc aac agt ggc aac agc ggc aac agc ggt tct ggg tcc cgg gac	1042
Asn Ser Asn Ser Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser Gly Ser Arg Asp	
280 285 290	
ata gaa aca tct aat ttt gat gaa ggc tat tcg gtc tcc agg gga acc	1090
Ile Glu Thr Ser Asn Phe Asp Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Gly Thr	
295 300 305	
ggc agc agg ggt gga agt ggt gga agt ggt gga agt ggt gga agt ggt	1138
Gly Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly	
310 315 320	
gga agt ggt gga agt ggt ggt gga aac aaa ccc gag tgt aac aac cca	1186
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asn Lys Pro Glu Cys Asn Asn Pro	
325 330 335	
ggg aat gat gtg cgc atg gcc gga gga tct ggg agt cag ggg cat ggg	1234
Gly Asn Asp Val Arg Met Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gln Gly His Gly	
340 345 350 355	

tcc aat ggt ggc aat ata caa aaa gaa gct gtc aat gga ctc aac act 1282  
 Ser Asn Gly Gly Asn Ile Gln Lys Glu Ala Val Asn Gly Leu Asn Thr  
 360 365 370

atg aac tcg gat gca tct acc ttg ccc ttc aac att gac aat ttc tgg 1330  
 Met Asn Ser Asp Ala Ser Thr Leu Pro Phe Asn Ile Asp Asn Phe Trp  
 375 380 385

gag aat ctt aag tcc aag acg cgc ttc att aac tgg gat gcc ata aac 1378  
 Glu Asn Leu Lys Ser Lys Thr Arg Phe Ile Asn Trp Asp Ala Ile Asn  
 390 395 400

aag ggt cat gcc cca tct ccc agc act cgg gct tta ctc tac ttc cgc 1426  
 Lys Gly His Ala Pro Ser Pro Ser Thr Arg Ala Leu Leu Tyr Phe Arg  
 405 410 415

aaa ctg tgg gag aat ttc aaa cgc agc act cct ttc ttc aac tgg aaa 1474  
 Lys Leu Trp Glu Asn Phe Lys Arg Ser Thr Pro Phe Phe Asn Trp Lys  
 420 425 430 435

cag att gag ggt tca gat ctg tca tct ctg cag aag agg gca ggt gga 1522  
 Gln Ile Glu Gly Ser Asp Leu Ser Ser Leu Gln Lys Arg Ala Gly Gly  
 440 445 450

gct gac cag ttt tct aag cct gaa gca aga caa gat ctt tca gct gac 1570  
 Ala Asp Gln Phe Ser Lys Pro Glu Ala Arg Gln Asp Leu Ser Ala Asp  
 455 460 465

tca tcc aag aac tac tac aat aac cag cag gtg aat cct act tac aac 1618  
 Ser Ser Lys Asn Tyr Tyr Asn Asn Gln Gln Val Asn Pro Thr Tyr Asn  
 470 475 480

tgg caa tac tat acc aag acc act gcc aag gcg gga gtc aca cct tca 1666  
 Trp Gln Tyr Tyr Thr Lys Thr Thr Ala Lys Ala Gly Val Thr Pro Ser  
 485 490 495

tct tcc tcg gct tcc cgg gca caa cct ggc ctg ctg aag tgg ctg aag 1714  
 Ser Ser Ser Ala Ser Arg Ala Gln Pro Gly Leu Leu Lys Trp Leu Lys  
 500 505 510 515

ttt tgg tag aacattcctt ctagtcactg cggactcctc acgaatgcac 1763  
 Phe Trp

acaggtcttc agggagtgtg actgtcctta cccagagtcc tctctgatgc agctgacctc 1823

cctgggcatg acaagcctgt catctcgcct ggggacctgg tttatctgtc ctcatctctc 1883

ccattcgatt gtggtgtctt ggcgactaat cagtttcatt gtataaccag ccagatcttc 1943



acctcttctt ccgtacgtga ccgcaagtcc ctggaacgag gcattctggag cttcctactc 2003  
tccagtttct ctgtggaaat aaaacatgac tctttgtttc 2043

<210> 4  
<211> 517  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 4  
Met Lys Leu Gln Gly Ser Leu Ala Cys Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala Ala Asn Pro Leu His Ser Gly Gly Glu Gly Thr Gly  
20 25 30

Ala Ser Ala Ala His Gly Ala Gly Asp Ala Ile Ser His Gly Ile Gly  
35 40 45

Glu Ala Val Gly Gln Gly Ala Lys Glu Ala Ala Ser Ser Gly Ile Gln  
50 55 60

Asn Ala Leu Gly Gln Gly His Gly Glu Glu Gly Gly Ser Thr Leu Met  
65 70 75 80

Gly Ser Arg Gly Asp Val Phe Glu His Arg Leu Gly Glu Ala Ala Arg  
85 90 95

Ser Leu Gly Asn Ala Gly Asn Glu Ile Gly Arg Gln Ala Glu Asp Ile  
100 105 110

Ile Arg Gln Gly Val Asp Ala Val His Asn Ala Gly Ser Trp Gly Thr  
115 120 125

Ser Gly Gly His Gly Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Gly Ala Gly Val Gln  
130 135 140

Gly Asn Pro Gly Pro Gln Gly Thr Pro Trp Ala Ser Gly Gly Asn Tyr  
145 150 155 160

Gly Thr Asn Ser Leu Gly Gly Ser Val Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly  
165 170 175

Pro Leu Asn Tyr Glu Thr Asn Ala Gln Gly Ala Val Ala Gln Pro Gly  
180 185 190

Tyr Gly Thr Val Arg Gly Asn Asn Gln Asn Ser Gly Cys Thr Asn Pro  
195 200 205

Pro Pro Ser Gly Ser His Glu Ser Phe Ser Asn Ser Gly Gly Ser Ser  
210 215 220

Asn Asp Gly Ser Arg Gly Ser Gln Gly Ser His Gly Ser Asn Gly Gln  
225 230 235 240

Gly Ser Ser Gly Arg Gly Gly Gly Gln Gly Asn Ser Asp Asn Asn Gly  
245 250 255

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Ser Asn Ser Gly  
260 265 270

Asn Ser Gly Asn Ser Asn Ser Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser Gly  
275 280 285

Ser Arg Asp Ile Glu Thr Ser Asn Phe Asp Glu Gly Tyr Ser Val Ser  
290 295 300

Arg Gly Thr Gly Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly  
305 310 315 320

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asn Lys Pro Glu Cys  
325 330 335

Asn Asn Pro Gly Asn Asp Val Arg Met Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gln  
340 345 350

Gly His Gly Ser Asn Gly Gly Asn Ile Gln Lys Glu Ala Val Asn Gly  
355 360 365

Leu Asn Thr Met Asn Ser Asp Ala Ser Thr Leu Pro Phe Asn Ile Asp  
370 375 380

Asn Phe Trp Glu Asn Leu Lys Ser Lys Thr Arg Phe Ile Asn Trp Asp  
385 390 395 400

Ala Ile Asn Lys Gly His Ala Pro Ser Pro Ser Thr Arg Ala Leu Leu  
405 410 415

Tyr Phe Arg Lys Leu Trp Glu Asn Phe Lys Arg Ser Thr Pro Phe Phe  
420 425 430

Asn Trp Lys Gln Ile Glu Gly Ser Asp Leu Ser Ser Leu Gln Lys Arg  
435 440 445

Ala Gly Gly Ala Asp Gln Phe Ser Lys Pro Glu Ala Arg Gln Asp Leu  
450 455 460

Ser Ala Asp Ser Ser Lys Asn Tyr Tyr Asn Asn Gln Gln Val Asn Pro

[illegible]



ttgtctctcc ttgtttcttc ccactgcact gtggtgcttc agtggccacc agcctcgtca 472  
 catacaccag catctttctg tacctcctcc ctttggtgac ctgaagtcac tgtgacagtt 532  
 ctccaggaag gaggagcttc ctacttttga gtttctctgt ggaaataaaa catgaatctt 592  
 gtttccctaa aaaaaaaaaa 610

<210> 6  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Met Lys Pro Ala Thr Ala Ser Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Trp Thr Gln Gly Ser His Gly Trp Gly Ala Asp Ala Ser Ser Leu  
 20 25 30  
 Gln Lys Arg Ala Gly Arg Ala Asp Gln Asn Tyr Asn Tyr Asn Gln His  
 35 40 45  
 Ala Tyr Pro Thr Ala Tyr Gly Gly Lys Tyr Ser Val Lys Thr Pro Ala  
 50 55 60  
 Lys Gly Gly Val Ser Pro Ser Ser Ser Ala Ser Arg Val Gln Pro Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Gln Trp Val Lys Phe Trp  
 85

<210> 7  
 <211> 1982  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (178)..(1608)  
 <223>

<400> 7  
 tctgagaagc ccaggcagtt gaggacagga gagagaaggc tgcagaccca gagggaggga 60  
 ggacagggag tcggaaggag gaggacagag gagggcacag agacgcagag caagggcggc 120

aaggaggaga ccctggtggg aggaagacac tctggagaga gagggggctg ggcagag 177  
  
atg aag ttc cag ggg ccc ctg gcc tgc ctc ctg ctg gcc ctc tgc ctg 225  
Met Lys Phe Gln Gly Pro Leu Ala Cys Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu  
1 5 10 15  
  
ggc agt ggg gag gct ggc ccc ctg cag agc gga gag gaa agc act ggg 273  
Gly Ser Gly Glu Ala Gly Pro Leu Gln Ser Gly Glu Glu Ser Thr Gly  
20 25 30  
  
aca aat att ggg gag gcc ctt gga cat ggc ctg gga gac gcc ctg agc 321  
Thr Asn Ile Gly Glu Ala Leu Gly His Gly Leu Gly Asp Ala Leu Ser  
35 40 45  
  
gaa ggg gtg gga aag gcc att ggc aaa gag gcc gga ggg gca gct ggc 369  
Glu Gly Val Gly Lys Ala Ile Gly Lys Glu Ala Gly Gly Ala Ala Gly  
50 55 60  
  
tct aaa gtc agt gag gcc ctt ggc caa ggg acc aga gaa gca gtt ggc 417  
Ser Lys Val Ser Glu Ala Leu Gly Gln Gly Thr Arg Glu Ala Val Gly  
65 70 75 80  
  
act gga gtc agg cag gtt cca ggc ttt ggc gca gca gat gct ttg ggc 465  
Thr Gly Val Arg Gln Val Pro Gly Phe Gly Ala Ala Asp Ala Leu Gly  
85 90 95  
  
aac agg gtc ggg gaa gca gcc cat gct ctg gga aac act ggg cac gag 513  
Asn Arg Val Gly Glu Ala Ala His Ala Leu Gly Asn Thr Gly His Glu  
100 105 110  
  
att ggc aga cag gca gaa gat gtc att cga cac gga gca gat gct gtc 561  
Ile Gly Arg Gln Ala Glu Asp Val Ile Arg His Gly Ala Asp Ala Val  
115 120 125  
  
cgc ggc tcc tgg cag ggg gtg cct ggc cac aat ggt gct tgg gaa act 609  
Arg Gly Ser Trp Gln Gly Val Pro Gly His Asn Gly Ala Trp Glu Thr  
130 135 140  
  
tct gga ggc cat ggc atc ttt ggc tct caa ggt ggc ctt gga ggc cag 657  
Ser Gly Gly His Gly Ile Phe Gly Ser Gln Gly Gly Leu Gly Gly Gln  
145 150 155 160  
  
ggc cag ggc aat cct gga ggt ctg ggg act ccg tgg gtc cac gga tac 705  
Gly Gln Gly Asn Pro Gly Gly Leu Gly Thr Pro Trp Val His Gly Tyr  
165 170 175  
  
ccc gga aac tca gca ggc agc ttt gga atg aat cct cag gga gct ccc 753  
Pro Gly Asn Ser Ala Gly Ser Phe Gly Met Asn Pro Gln Gly Ala Pro  
180 185 190

tgg ggt caa gga ggc aat gga ggg cca cca aac ttt ggg acc aac act 801  
 Trp Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Pro Pro Asn Phe Gly Thr Asn Thr  
 195 200 205

cag gga gct gtg gcc cag cct ggc tat ggt tca gtg aga gcc agc aac 849  
 Gln Gly Ala Val Ala Gln Pro Gly Tyr Gly Ser Val Arg Ala Ser Asn  
 210 215 220

cag aat gaa ggg tgc acg aat ccc cca cca tct ggc tca ggt gga ggc 897  
 Gln Asn Glu Gly Cys Thr Asn Pro Pro Pro Ser Gly Ser Gly Gly Gly  
 225 230 235 240

tcc agc aac tct ggg gga ggc agc ggc tca cag tcg ggc agc agt ggc 945  
 Ser Ser Asn Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gln Ser Gly Ser Ser Gly  
 245 250 255

agt ggc agc aat ggt gac aac aac aat ggc agc agc agt ggt ggc agc 993  
 Ser Gly Ser Asn Gly Asp Asn Asn Asn Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ser  
 260 265 270

agc agt ggc agc agc agt ggc ggc agc agt ggc ggc agc agt ggt ggc 1041  
 Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Gly Gly  
 275 280 285

agc agt ggc aac agt ggt ggc agc aga ggt gac agc ggc agt gag tcc 1089  
 Ser Ser Gly Asn Ser Gly Gly Ser Arg Gly Asp Ser Gly Ser Glu Ser  
 290 295 300

tcc tgg gga tcc agc acc ggc tcc tcc tcc ggc aac cac ggt ggg agc 1137  
 Ser Trp Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Ser Gly Asn His Gly Gly Ser  
 305 310 315 320

ggc gga gga aat gga cat aaa ccc ggg tgt gaa aag cca ggg aat gaa 1185  
 Gly Gly Gly Asn Gly His Lys Pro Gly Cys Glu Lys Pro Gly Asn Glu  
 325 330 335

gcc cgc ggg agc ggg gaa tct ggg att cag aac tct gag acg tct cct 1233  
 Ala Arg Gly Ser Gly Glu Ser Gly Ile Gln Asn Ser Glu Thr Ser Pro  
 340 345 350

ggg atg ttt aac ttt gac act ttc tgg aag aat ttt aaa tcc aag ctg 1281  
 Gly Met Phe Asn Phe Asp Thr Phe Trp Lys Asn Phe Lys Ser Lys Leu  
 355 360 365

ggt ttc atc aac tgg gat gcc ata aac aag aac cag gtc ccg ccc ccc 1329  
 Gly Phe Ile Asn Trp Asp Ala Ile Asn Lys Asn Gln Val Pro Pro Pro  
 370 375 380

agc acc cga gcc ctc ctc tac ttc agc cga ctc tgg gag gat ttc aaa 1377  
 Ser Thr Arg Ala Leu Leu Tyr Phe Ser Arg Leu Trp Glu Asp Phe Lys



385	390	395	400	
cag aac act cct ttc ctc aac tgg aaa gca att att gag ggt gcg gac				1425
Gln Asn Thr Pro Phe Leu Asn Trp Lys Ala Ile Ile Glu Gly Ala Asp				
	405	410	415	
gcg tca tca ctg cag aaa cgt gca ggc aga gcc gat cag aac tac aat				1473
Ala Ser Ser Leu Gln Lys Arg Ala Gly Arg Ala Asp Gln Asn Tyr Asn				
	420	425	430	
tac aac cag cat gcg tat ccc act gcc tat ggt ggg aag tac tca gtc				1521
Tyr Asn Gln His Ala Tyr Pro Thr Ala Tyr Gly Gly Lys Tyr Ser Val				
	435	440	445	
aag acc cct gca aag ggg gga gtc tca cct tct tcc tcg gct tcc cgg				1569
Lys Thr Pro Ala Lys Gly Gly Val Ser Pro Ser Ser Ser Ala Ser Arg				
	450	455	460	
gtg caa cct ggc ctg ctg cag tgg gtg aag ttt tgg tag gcaatttctt				1618
Val Gln Pro Gly Leu Leu Gln Trp Val Lys Phe Trp				
	465	470	475	
gcaaccacca ccgaggcccc gaaaagcact ggctcgtcagg gagctcctcc ccttggcccc				1678
cagcctgtgc cagccctggc ccggctgcca cacctctgtt tcctaggctg gggacccagc				1738
ttgtctctcc ttgtttcttc ccactgcact gtggtgcttc agtggccacc agcctcgtca				1798
catacaccag catctttctg tacctcctcc ctttggtgac ctgaagtcac tgtgacagtt				1858
ctccaggaag gaggagcttc ctacttttga gtttctctgt ggaaataaaa catgaatctt				1918
gtttccctaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa				1978
aaaa				1982

<210> 8  
 <211> 476  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8  
 Met Lys Phe Gln Gly Pro Leu Ala Cys Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Gly Glu Ala Gly Pro Leu Gln Ser Gly Glu Glu Ser Thr Gly  
 20 25 30

Thr Asn Ile Gly Glu Ala Leu Gly His Gly Leu Gly Asp Ala Leu Ser

出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 5 3 6 3

Ser Trp Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Ser Gly Asn His Gly Gly Ser  
305 310 315 320

Gly Gly Gly Asn Gly His Lys Pro Gly Cys Glu Lys Pro Gly Asn Glu  
325 330 335

Ala Arg Gly Ser Gly Glu Ser Gly Ile Gln Asn Ser Glu Thr Ser Pro  
340 345 350

Gly Met Phe Asn Phe Asp Thr Phe Trp Lys Asn Phe Lys Ser Lys Leu  
355 360 365

Gly Phe Ile Asn Trp Asp Ala Ile Asn Lys Asn Gln Val Pro Pro Pro  
370 375 380

Ser Thr Arg Ala Leu Leu Tyr Phe Ser Arg Leu Trp Glu Asp Phe Lys  
385 390 395 400

Gln Asn Thr Pro Phe Leu Asn Trp Lys Ala Ile Ile Glu Gly Ala Asp  
405 410 415

Ala Ser Ser Leu Gln Lys Arg Ala Gly Arg Ala Asp Gln Asn Tyr Asn  
420 425 430

Tyr Asn Gln His Ala Tyr Pro Thr Ala Tyr Gly Gly Lys Tyr Ser Val  
435 440 445

Lys Thr Pro Ala Lys Gly Gly Val Ser Pro Ser Ser Ser Ala Ser Arg  
450 455 460

Val Gln Pro Gly Leu Leu Gln Trp Val Lys Phe Trp  
465 470 475

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

ggacgcccac ctttcattctt c

21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 10

atctggcggg tggtggagg

19

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 11

cagttctaca tttgtgttgc acgtc

25

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 12

ttggacagac tctggaggaa gtcag

25

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 13

ttgaaaggac ccagtgctg aactgc

26

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

atggagctgc ccacaatgag tggtacag

28

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

cctacctggc cgtgcaag

18

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

catgagaaag ttaagcccat cg

22

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

gtcgacgcca ccatgaacat gaagccggcc actgc

35

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 18  
gcggccgccc aaaacttcac ccactgcagc agg

33

<210> 19  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 19  
gtcgacgcca ccatgaagtt ccaggggccc ctgg

34

<210> 20  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 20  
gcggccgccc aaaacttcac ccactgcagc agg

33

<210> 21  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 21  
gtcgacgcca ccatgaagat cccggtcctt cctgcc

36

<210> 22  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 22  
gcggccgcct gggcatcagg agttgcgctc

30



<210> 23  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 23  
aattgtcgac gccaccatgc atcttgacg tctggtcgg 39

<210> 24  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 24  
atatgcggcc gcgcagctgg ttggcctcct tgctgg 36

<210> 25  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 25  
gactgtacga gagcacaacc atg 23

<210> 26  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 26  
ctgaacccca gctgtggc 18

<210> 27  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 27  
catgccccat ctcccagc 18

<210> 28  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 28  
ccctcaatct gtttccagtt gaag 24

<210> 29  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 29  
actggcacgt catcactgat atgttc 26

<210> 30  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 30  
ggaatcagga gcggcacttc 20

<210> 31  
<211> 25

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 31  
gtcaacaagc catttatcaa cttcc

25

<210> 32  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 32  
gtgtgacaac cggagcattc

20

<210> 33  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 33  
aaggtggtga agcaggcatc tgag

24

<210> 34  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 34  
ggaagagtgg gagttgctgt tgaagtc

27

<210> 35  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 35

atgaacatga agccggccac

20

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 36

cgtttctgca gtgatgacgc g

21

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 37

aaaggccatt ggcaaagagg cc

22

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 38

accctgttgc ccaaagcatc tg

22

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 39

aactggcacg ccctctttga gtctatc

27

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 40

atggtcactg ggcatcagga gttg

24

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 41

aaccagctgc tgaatggcaa cca

23

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 42

atgaaaggcg tggtgaccga gg

22

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 43  
cttggcagaa acagaaggtc gctac

25

<210> 44  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 44  
cggtttcagc tcgaatctct tgc

23

<210> 45  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 45  
ccacccaaac ataaataacc acccg

25

<210> 46  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 46  
tagcggaccc gaaataagtg gagc

24

<210> 47  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 47  
atgtctcagg ccacgtcaag

20

<210> 48  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 48  
ctgctcccag taacgtgagg 20

<210> 49  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 49  
atcaagatca ttgctcctcc tgag 24

<210> 50  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 50  
tgcttgctga tccacatctg c 21

<210> 51  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 51  
acttcaacag cgacacccac tc 22



<210> 52  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 52  
 cctgttgctg tagccaaatt cg

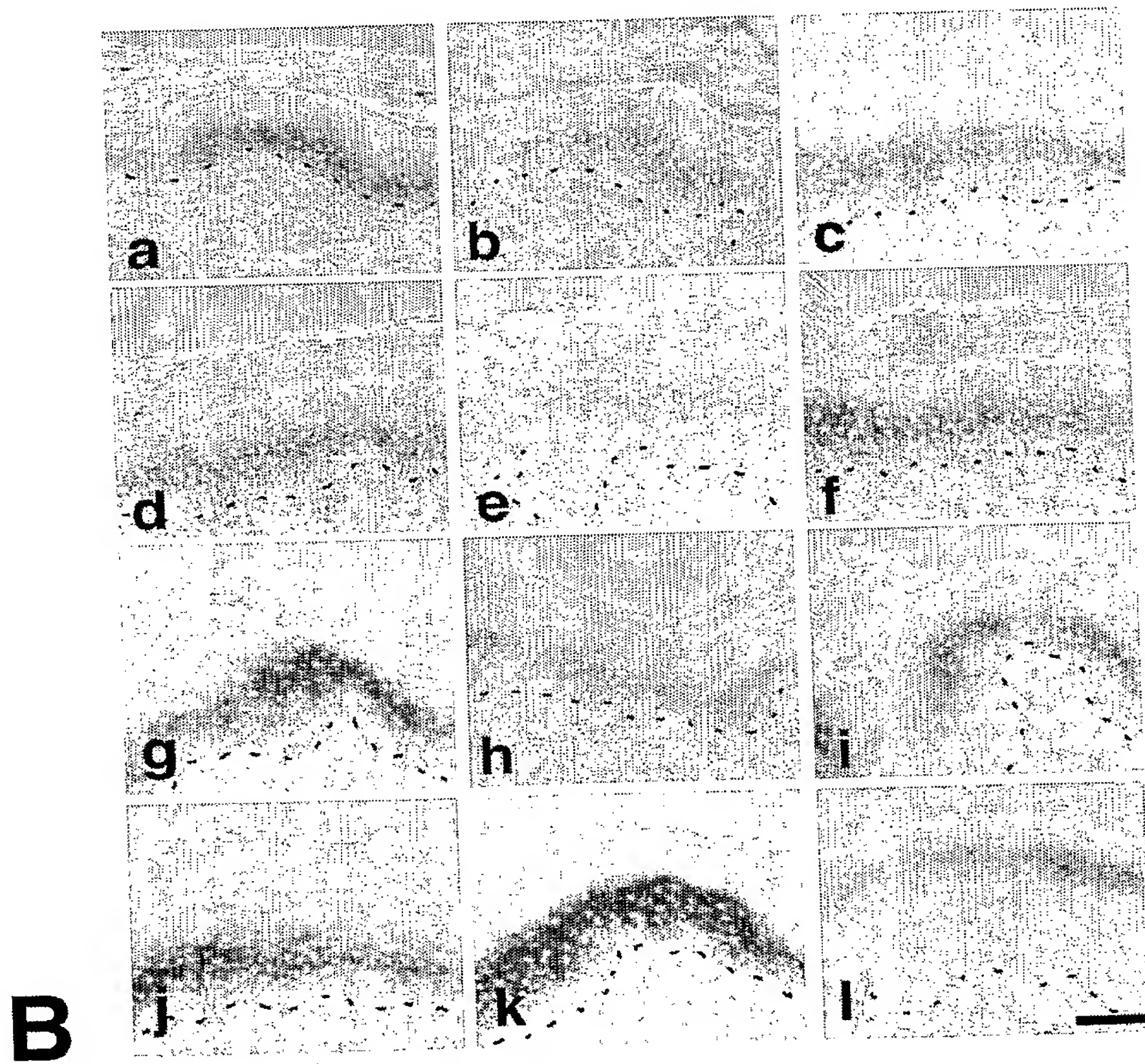
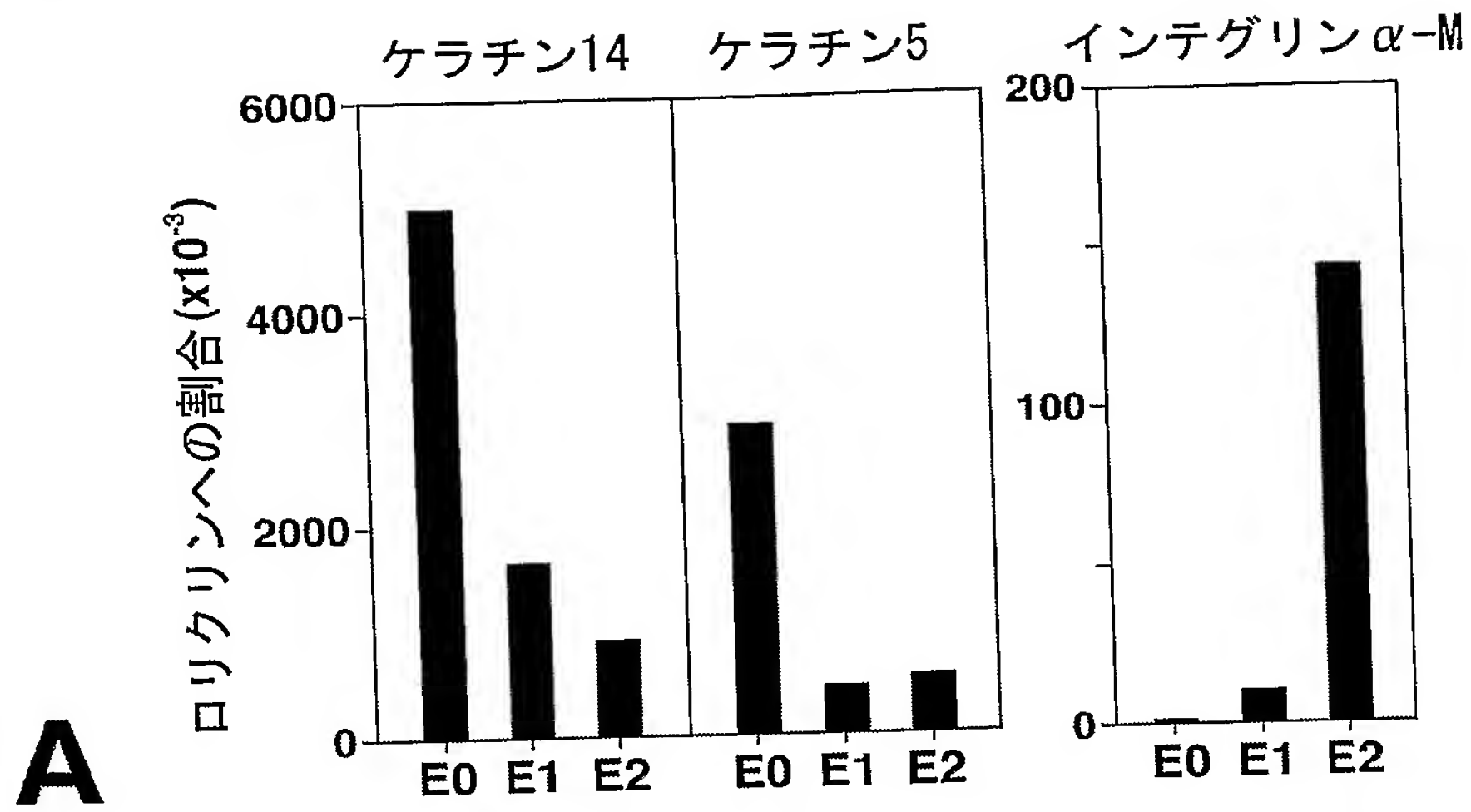
22

<210> 53  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

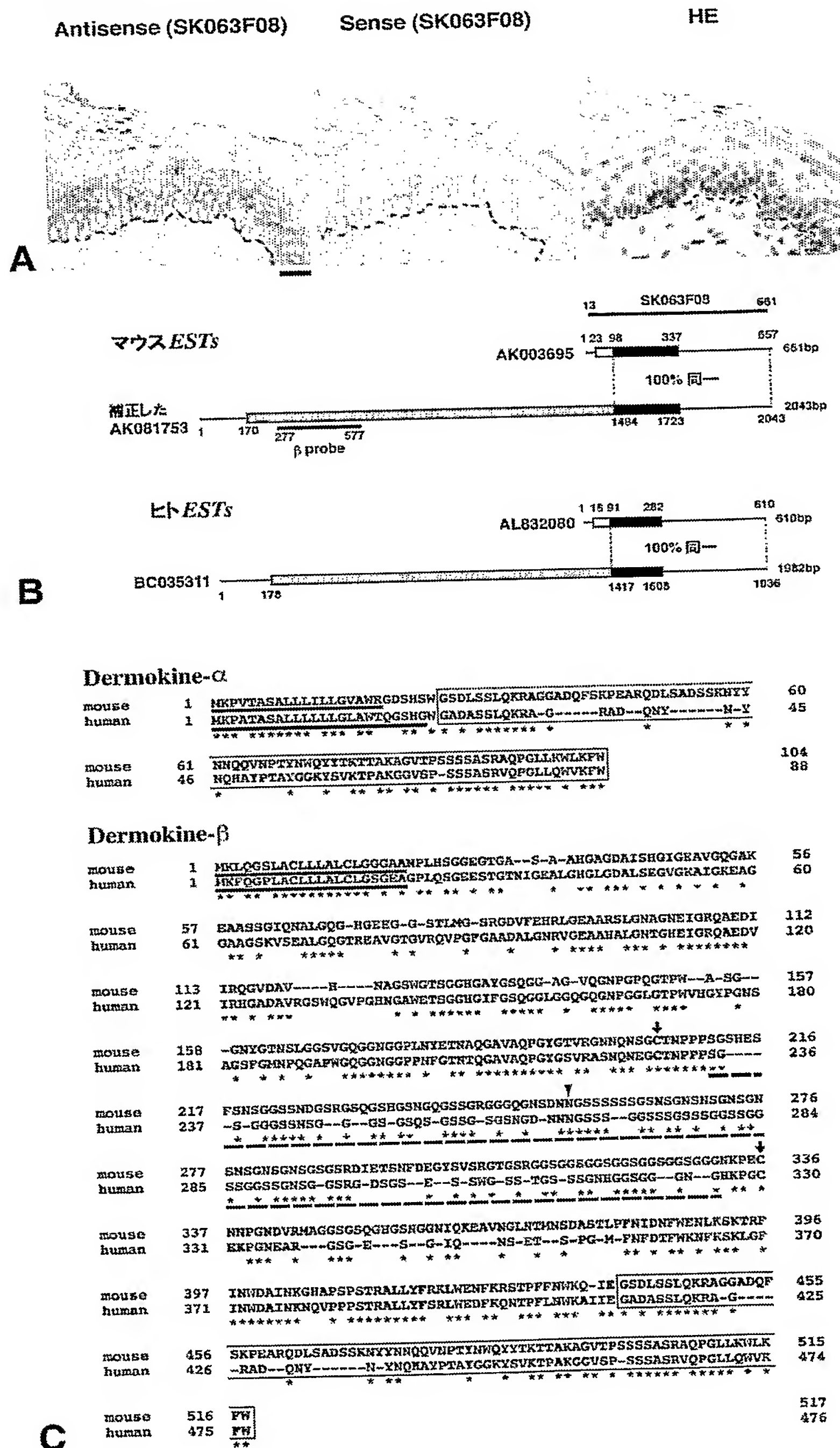
<400> 53  
 Met Lys Pro Val Thr Ala Ser Ala Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Val  
 1 5 10 15  
 Ala Trp Arg Gly Asp Ser His Ser Trp Gly Ser Asp Leu Ser Ser Leu  
 20 25 30  
 Gln Lys Arg Ala Gly Gly Ala Asp Gln Phe Ser Lys Pro Glu Ala Arg  
 35 40 45  
 Gln Asp Leu Ser Ala Asp Ser Ser Lys Asn Tyr Tyr Asn Asn Gln Gln  
 50 55 60  
 Val Asn Pro Thr Tyr Asn Trp Gln Tyr Tyr Thr Lys Thr Thr Ala Lys  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Val Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ala Ser Arg Ala Gln Pro Gly  
 85 90 95  
 Leu Leu Lys Trp Leu Lys Phe Trp  
 100

【書類名】 図面

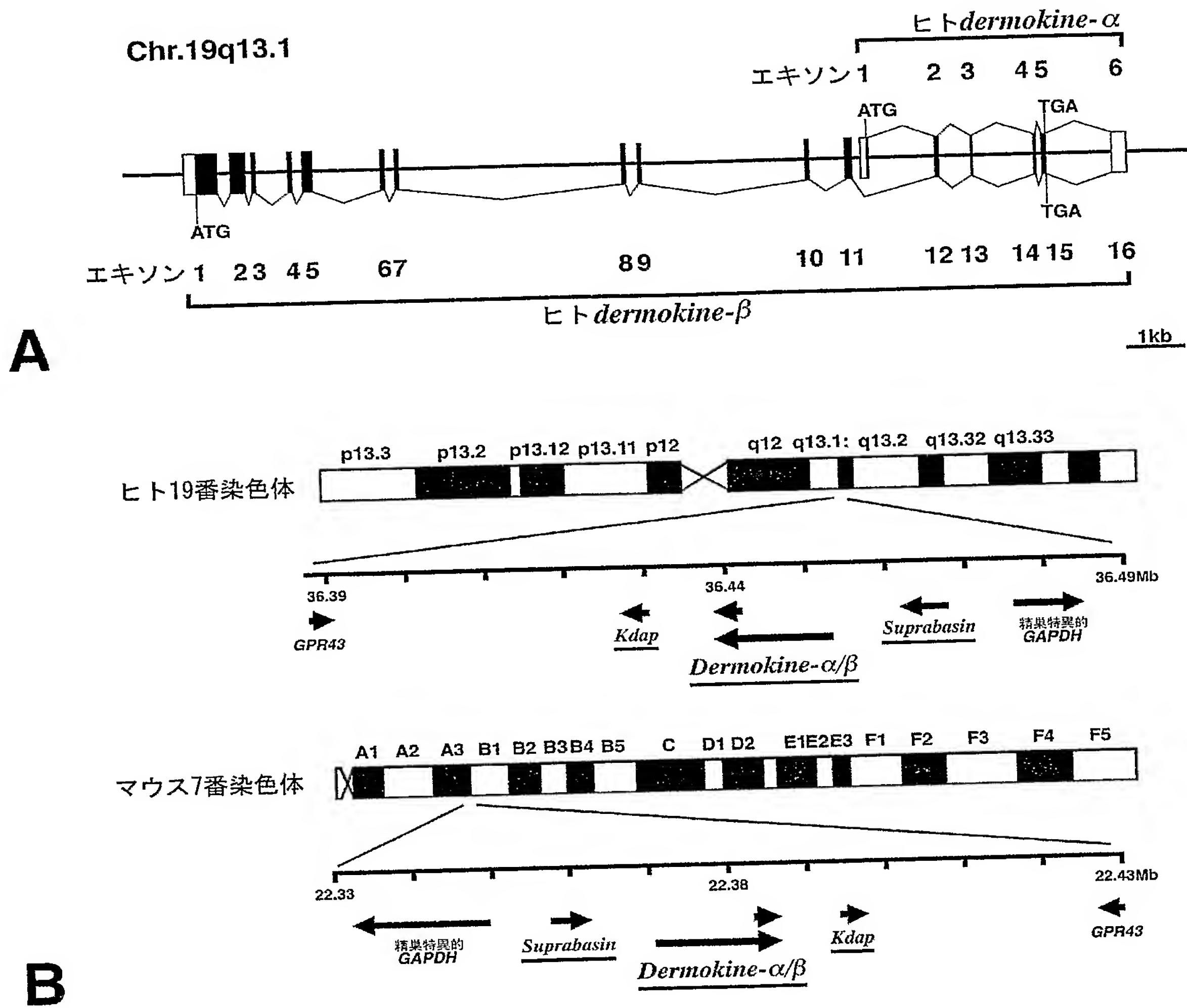
【図 1】



## 【図 2】

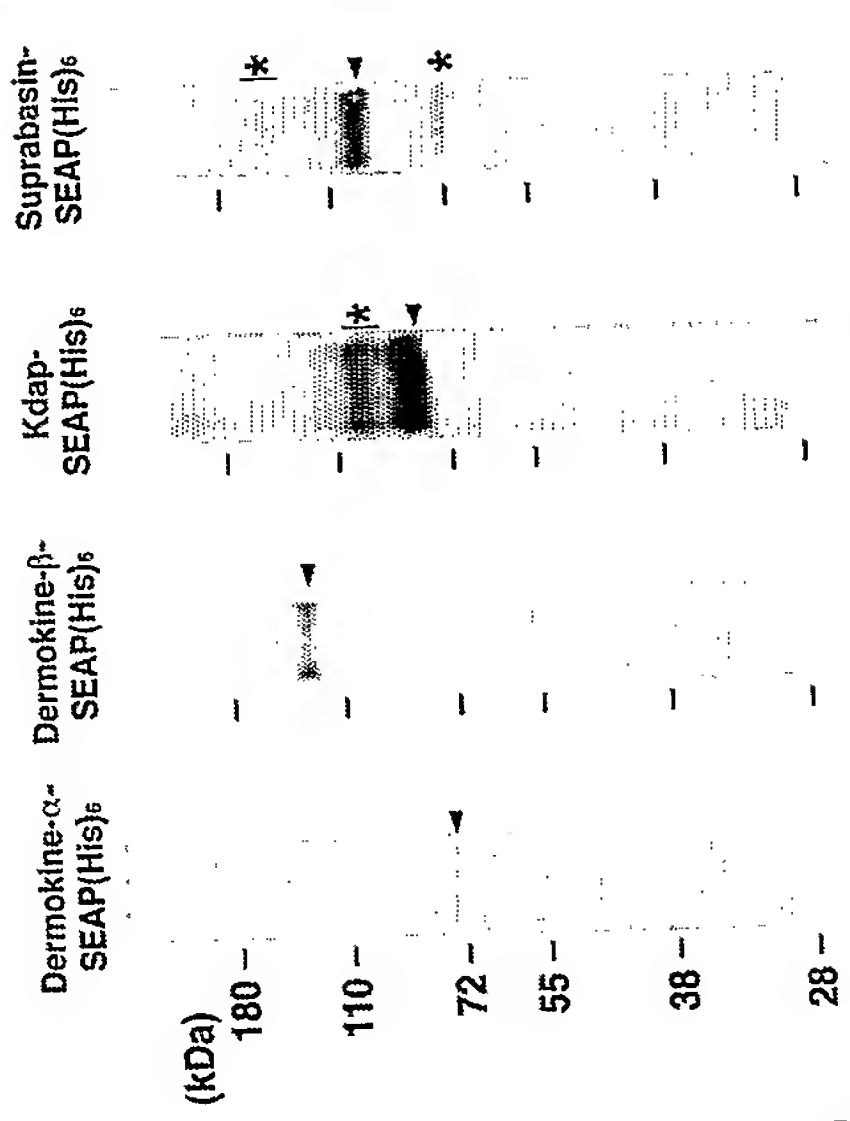


【図 3】



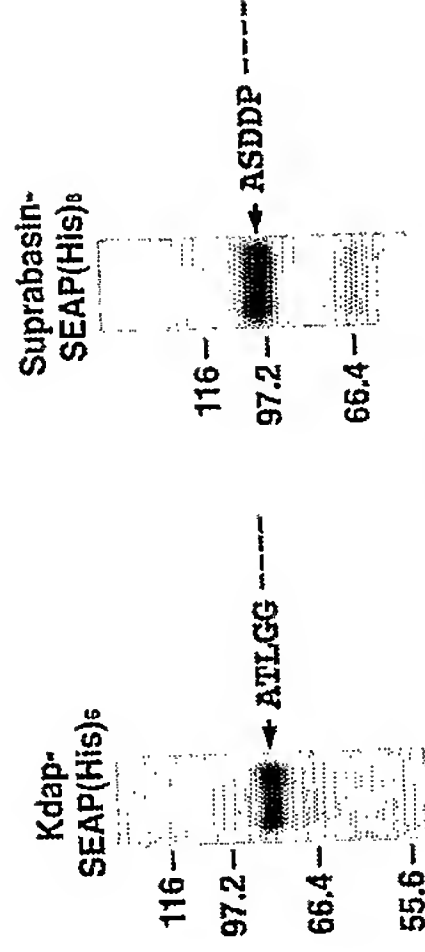
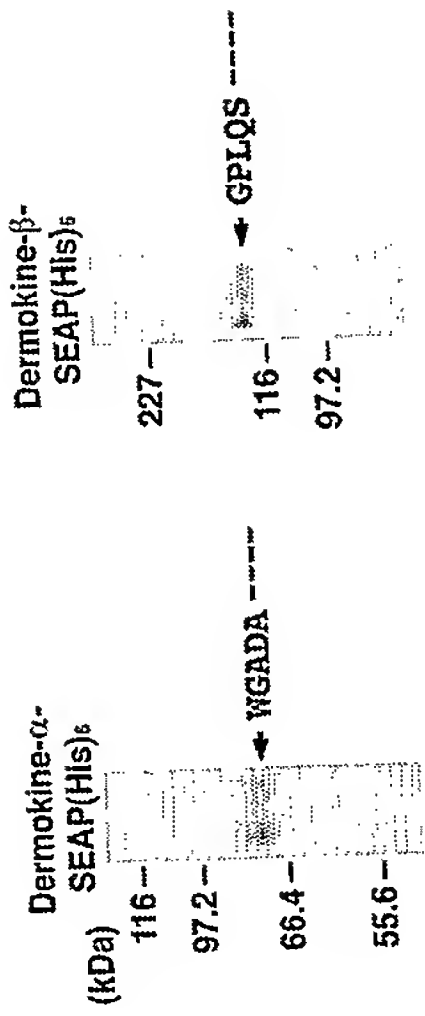
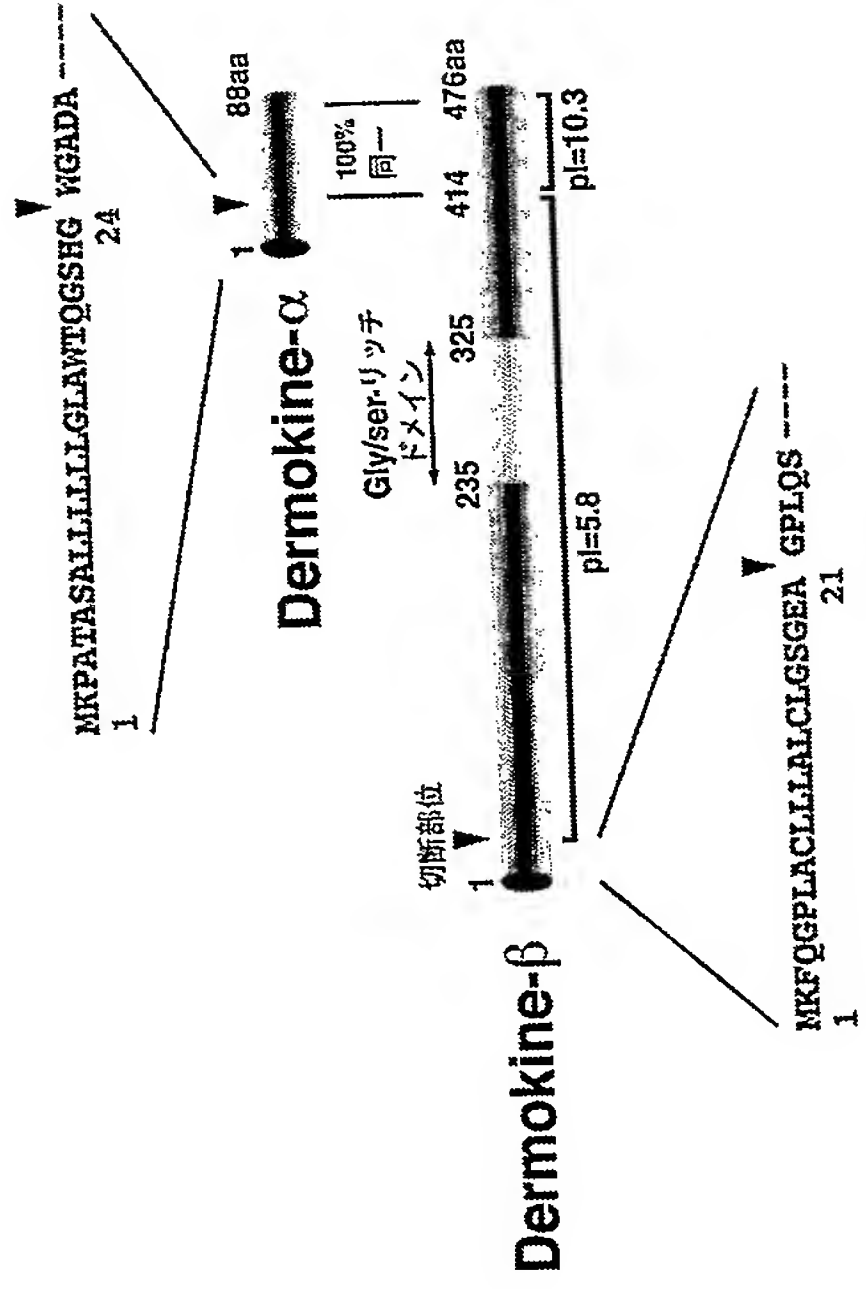


【図4】



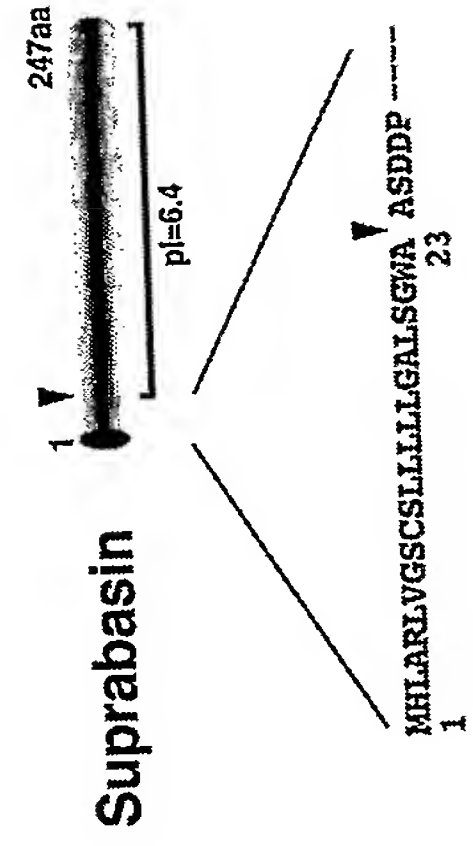
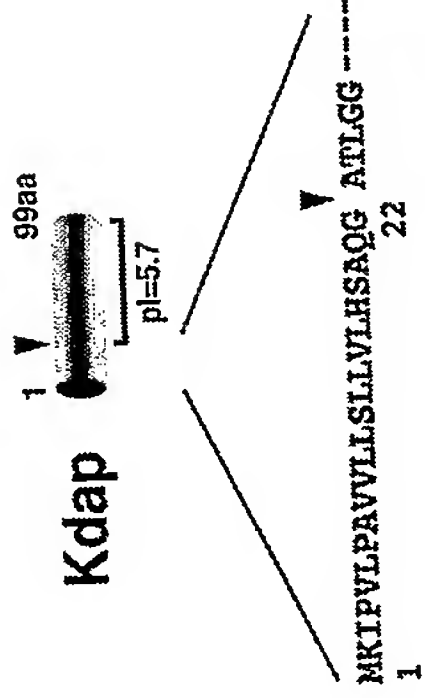
抗-Hisイムノブロット

B



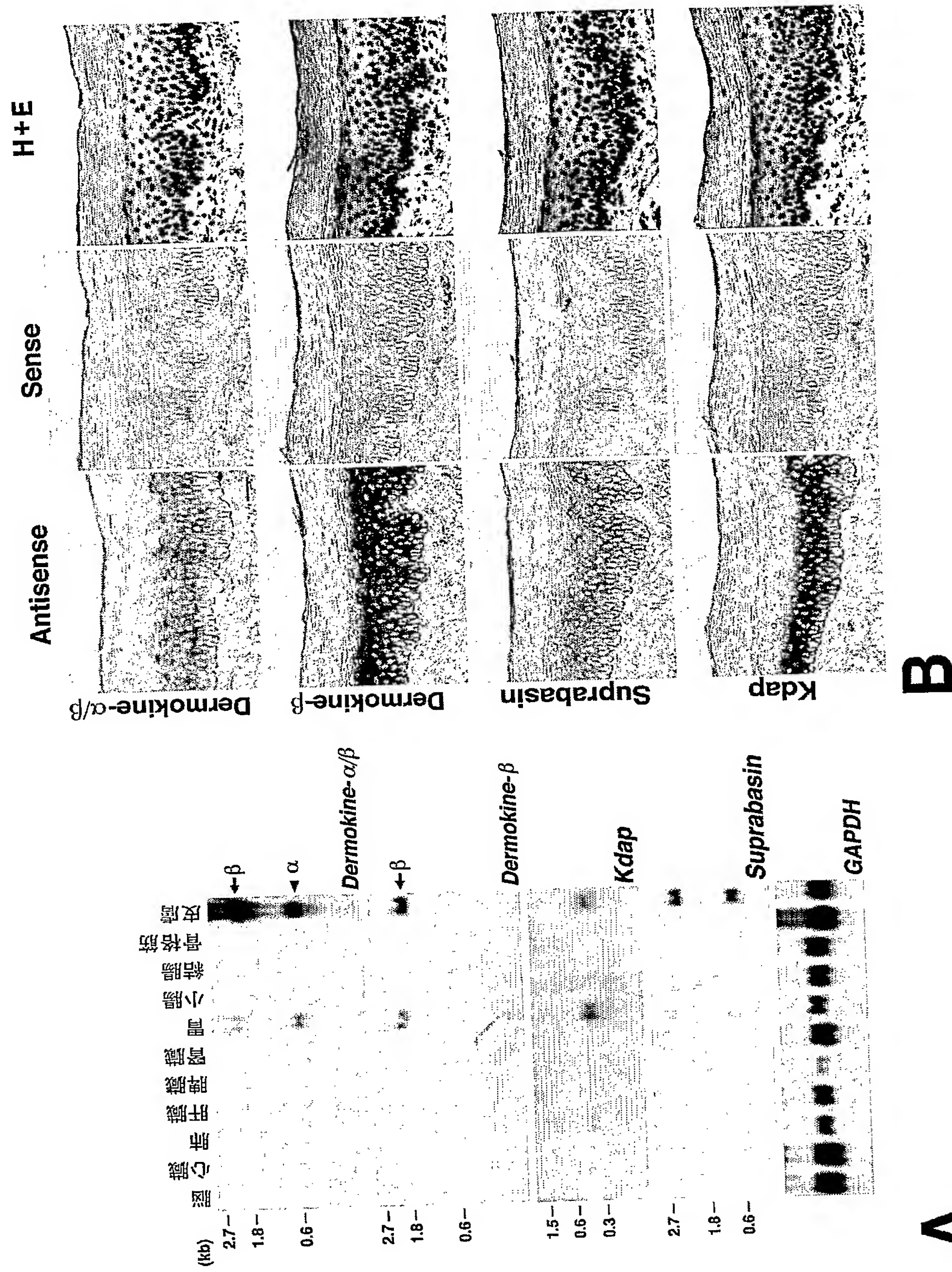
クーマシー

C

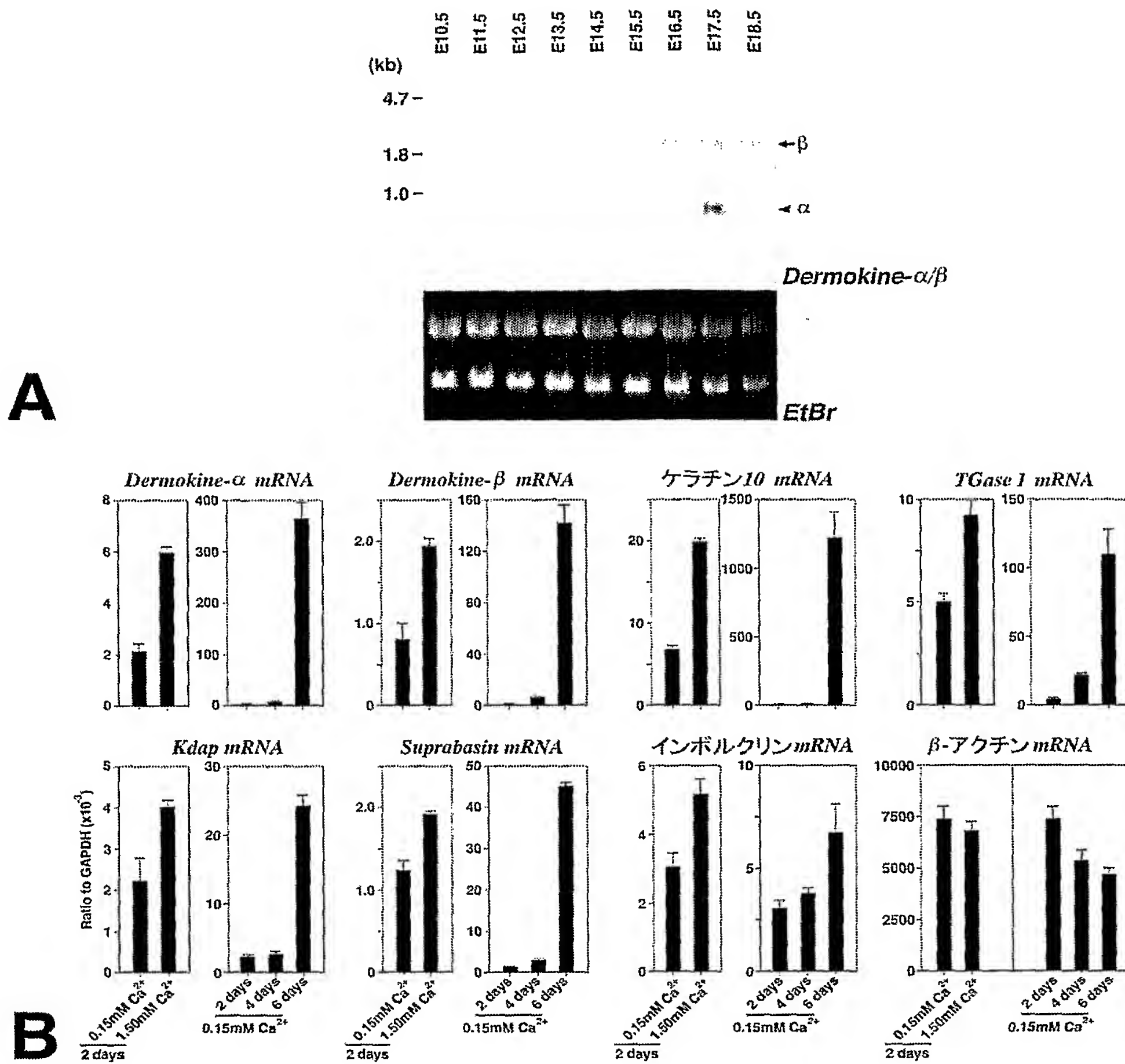


A

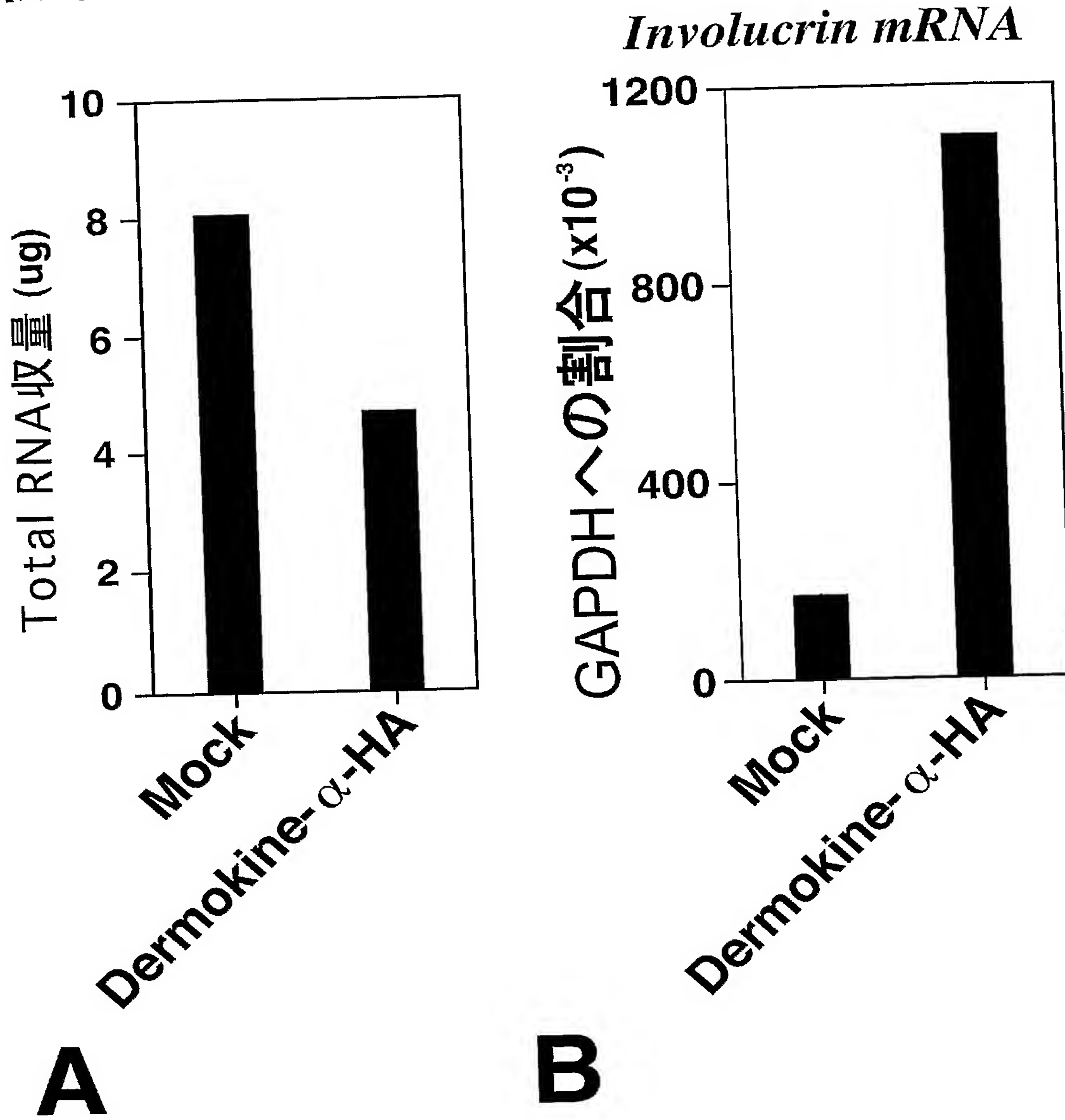
【図 5】



【図 6】

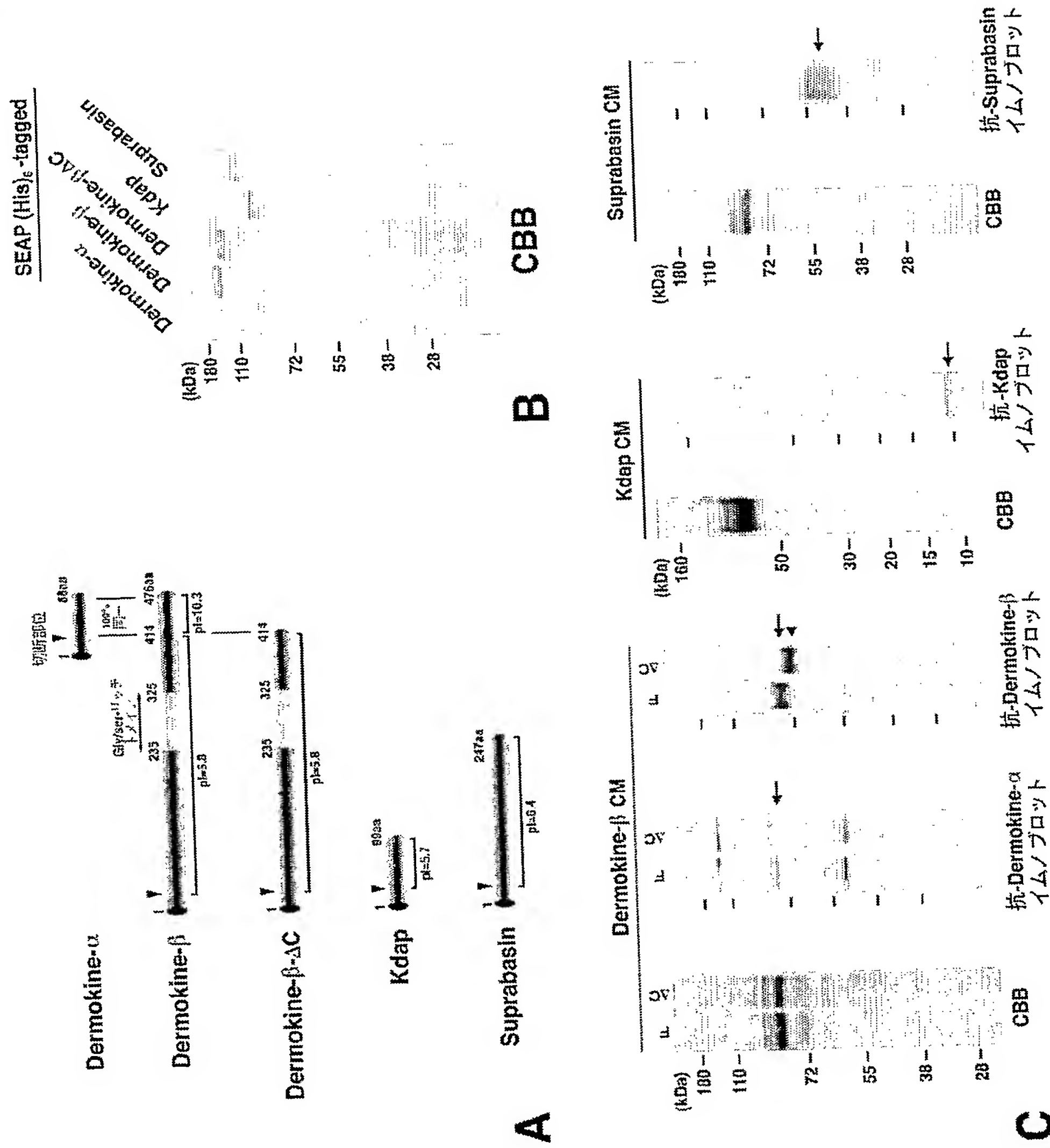


【図 7】





【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、表皮分化に関与する新規遺伝子の提供を課題とする。

【解決手段】 表皮分化にかかわる新規遺伝子を同定する目的で、ハイスループット in situ ハイブリダイゼーションシステム法をマウス足蹠表皮に対して適用した。その結果、約100種のユニークなmRNAの表皮における発現パターンが検出された。その中から、基底層上層の分化した表皮層で発現される2つの新規分泌タンパク質 dermokine- $\alpha$  および- $\beta$  を同定することに成功した。また、上記タンパク質をコードする遺伝子は、新規遺伝子複合体(SC)を構成していることが判明した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 5 7 5 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 2 1 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 1 0 号

氏 名

エーザイ株式会社